



Universidad
Zaragoza

Trabajo Fin de Máster

DISEÑO DE APÓSITOS LIBERADORES DE FÁRMACOS,
MEDIANTE IMPRESIÓN 3D, QUE CONTIENEN
ANESTÉSICOS TÓPICOS PARA SU LIBERACIÓN
SOSTENIDA EN APLICACIONES DÉRMICAS

DESIGN OF DRUG-RELEASING DRESSINGS BY 3D
PRINTING CONTAINING TOPICAL ANAESTHETICS FOR
SUSTAINED RELEASE IN DERMAL APPLICATIONS

Autor

Adrián Tajadura Cubillo

Directores

Manuel Arruebo Gordo

Laura Usón Muñoz

Titulación del autor

Máster en Ingeniería Biomédica

ESCUELA DE INGENIERÍA Y ARQUITECTURA

2021

Agradecimientos

Quiero agradecer a Laura Usón Muñoz, una de mis tutoras, sus consejos en estos meses, y haberme enseñado a utilizar todas las técnicas y herramientas aplicadas en este trabajo; en especial, la impresora 3D; aprender esa destreza era uno de mis objetivos. Por otro lado, quiero agradecer también a Manuel Arruebo Gordo, director del proyecto, haber confiado en mí para este proyecto tan prometedor y por haberme ofrecido vías de solución a los problemas que iban surgiendo. Este trabajo tampoco hubiera sido posible sin el consejo, apoyo y experiencia de los compañeros del laboratorio, en especial a Cristina Yus Argón.

Así mismo agradezco a la Universidad de Zaragoza y a todos los profesores que he tenido, por haber fomentado en mí el interés por la Ingeniería Biomédica y sus aplicaciones en el mundo real. Por último, a mi familia y amigos por su apoyo incondicional.

Resumen

Diseño de apósitos liberadores de fármacos, mediante impresión 3D, que contienen anestésicos tópicos para su liberación sostenida en aplicaciones dérmicas

El presente Trabajo de Fin de Máster describe un método novedoso de fabricación de apósitos tópicos para el suministro de anestésicos locales en el tratamiento del dolor neuropático, mediante la técnica de impresión 3D de modelado por deposición fundida. Se pretende demostrar que estos apósitos aventajan a los fabricados con el método convencional en dos aspectos: liberan una cantidad mayor de fármaco y son capaces de liberarlo de forma sostenida y controlada, en vez de forma abrupta. La diferencia entre ambos métodos radica en que, en el propuesto, los filamentos del material con el que se imprimen los apósitos son extruidos a partir de una mezcla física de biopolímero con el principio activo; es decir, que el fármaco forma parte de la estructura constitutiva del dispositivo; mientras que en el método convencional el apósito es impreso a partir de un biomaterial, y después, se le impregna con el principio activo.

El estudio desarrollado consiste en la impresión de dos tipos de apósitos aplicando los dos procedimientos ya mencionados. A su vez, mediante el método propuesto se fabrican otros dos tipos de apósitos con biomateriales diferentes con el fin de estudiar cómo influye el biomaterial en la funcionalidad final del apósito: cantidad de fármaco que libera y perfil de liberación. Los polímeros seleccionados fueron el Eudragit® RS100 (EuRS100), y la policaprolactona (PCL), siguiendo criterios de selección de fármacos adecuados para fabricación apósitos. El Eudragit® RS100 fue seleccionado por ser imprimible, no tóxico, mucoadhesivo, pH-independiente, y degradarse lentamente por erosión. El PCL se escoge por ser biocompatible y de los más utilizados en la impresión 3D. Respecto al fármaco, en el estudio, se trabaja con la bupivacaína hidrosoluble como principio activo anestésico.

Con las técnicas de termogravimetría y análisis por transformada de Fourier infrarroja se valora la compatibilidad del fármaco elegido con los distintos polímeros. La cuantificación del fármaco presente en los apósitos se realiza mediante la espectrofotometría ultravioleta/visible (UV-Vis), ya que la bupivacaína hidrosoluble, presenta una importante absorción a 261 nm de longitud de onda. Uno de los problemas abordados ha sido la eliminación del EuRS100 en las muestras utilizadas el cálculo de la cantidad de materia presente en el apósito ya que también ese polímero tiene absorbancia en ese rango.

Los resultados del estudio muestran que mediante el método propuesto es posible elaborar apósitos con una mayor carga de principio activo y un perfil de liberación sostenida del fármaco; mientras que, con el método convencional por impregnación, la liberación es repentina. También muestran que el tipo de biomaterial seleccionado para la fabricación de los filamentos con los que se imprime el apósito en 3D, sí influye tanto en la cantidad de fármaco liberada, como el perfil de liberación. En el caso del EuRS100, el perfil de liberación es relativamente similar al de la policaprolactona, pero la cantidad de fármaco liberado es mayor. Con lo que se concluye que el EuRS100 es el polímero más eficiente de los dos utilizados en las pruebas de fabricación de apósitos según el método propuesto en el estudio.

Palabras clave: Extrusión en caliente, Impresión 3D, apósitos tópicos, Bupivacaína, Eudragit® RS100, Policaprolactona, liberación sostenida, espectrometría ultravioleta-visible, termogravimetría, transformada de Fourier infrarroja.

Abstract

Design of drug-releasing dressings by 3d printing containing topical anesthetics for sustained release in dermal applications.

This Master's Thesis proposes a novel method of manufacturing topical patches for the supply of local anesthetics in the treatment of neuropathic pain, by means of 3D printing FDM, (Modeling by Fused Deposition). It is intended to show that these drug administrators are superior to those manufactured with the conventional method in two key aspects: they can release greater amounts of drug, and steadily, rather than abruptly. The difference between both methods is that, in the one proposed, the filaments with which the patches are printed, had been extruded from a physical mixture of biopolymer plus the chosen pharmacological ingredient; in other words, the drug is part of the constitutive structure of the patch designed. However, in the conventional method, they are printed from a biomaterial, and later, impregnated with the active principle.

The study carried out consists of the impression of two types of patches applying the two aforementioned procedures. Besides, two other types of patches are manufactured by the novel method with different biomaterials. The purpose is to study how the biomaterial influences the final functionality of the patch: the amount of drug released, and the release profile. The polymers selected were Eudragit® RS100 (EuRS100), and polycaprolactone (PCL), following the criteria for selecting the most suitable drugs for manufacturing dressings. Eudragit® RS100 (EuRS100) has been selected for being printable, non-toxic, mucoadhesive, pH-independent, and able to slowly wear away on the skin. Polycaprolactone has been chosen for being biocompatible, and commonly used in 3D printing. Regarding the drug, this study has worked with hydrosoluble bupivacaine as anesthetic active principle.

The compatibility study of the chosen drug with the different polymers, is assessed using FTIR (Thermogravimetry and Infrared Fourier Transform Analysis Techniques). The quantification of the drug is carried out by the photospectrometry in the ultraviolet - visible range (UV-Vis), since the hydrosoluble bupivacaine has a significant absorption at wavelength 261 nm. One of the problems addressed has been the elimination of EuRS100 in the samples used to calculate the amount of material present in the patches, since this polymer also has absorbance in that range.

The results of the study show that with the novel method the patches contain a higher load of the active medical ingredient. In addition, they have a sustained drug release profile. In contrast, with the conventional impregnation method, the release of the drug occurs suddenly. They also show that the type of biomaterial selected for the manufacture of the filaments applying the new method, does influence both, the amount of drug released and the release profile. In the case of EuRS100, the release profile is quite similar to the polycaprolactone one, but the amount of drug released is higher. All in all consider, it can be concluded that EuRS100 is the most efficient polymer of the two used in the patches manufacturing tests, at least, according to the method developed in the study.

Keywords: Hot melt extrusion, 3D printing, topical patches, Bupivacaine, Eudragit® RS100, Polycaprolactone, sustained release, ultraviolet-visible spectrometry, thermogravimetry, Fourier transform infrared.

Índice

Resumen.....	IV
1. Introducción y estado del arte	1
1.1 Los polímeros de Eudragit® y la policaprolactona	1
1.2 La piel como medio de administración de fármacos y la estructura cutánea	2
1.3 Transporte de sustancias a través de la piel	5
1.4 Funcionamiento de las anestésicos locales	6
1.5 Sistemas para la liberación controlada de fármacos	7
1.6 Apósitos comerciales	9
2. Objetivos del estudio.....	10
3. Técnicas, instrumentos, y métodos de caracterización	10
3.1 Técnicas e Instrumentos	10
3.1.1 FTIR: Transformada de Fourier infrarroja	10
3.1.2 TGA: Termogravimetría	11
3.1.3 La Espectrofotometría Ultravioleta-Visible (UV-Vis):	11
3.1.4 La extrusión y la impresión 3D	12
3.2 Métodos y materiales	13
3.2.1 Preparación de las mezclas físicas	13
3.2.2 Preparación de los filamentos mediante extrusión en caliente.	14
3.2.3 Impresión 3D de los apósitos (FDM)	14
3.2.4 Absorción de agua	15
3.2.5 Elección del disolvente y precipitado del polímero	16
3.2.6 Estudios de estabilidad térmica de la bupivacaína	16
3.2.7 Estudio de liberación.....	16
3.2.8 Impregnación de los apósitos de EuRS100.....	17
4. Resultados:	18
4.1 Elección de los disolventes	18
4.2 Mezcla física, filamentos y apósitos creados.....	19
4.3 Caracterización de los apósitos	23
4.3.1 Durabilidad de la bupivacaína: TGA y degradación en agua (UV-Vis)	23
4.3.2 Absorción de agua.	23
4.3.3 Impregnación de apósitos de EuRS100	24
4.3.4 Rectas de calibrado	25
4.3.5 Liberación de fármaco	27
5. Conclusión	30
Bibliografía	32
Anexos	35
Anexo 1: Parámetros de impresión	35
Anexo 2: Análisis TGA	36
Anexo 3: Análisis FTIR	42

Índice de figuras

Figura 1 Izquierda: liberación tópica. Derecha: liberación transdérmica. Imagen obtenida de R. Muzzalupo et al. ⁹ DDDS: siglas en inglés de sistema dérmico de administración de fármacos (Dermal Drug Delivery System). TDDS: siglas en inglés de sistema transdérmico de administración de fármacos (Transdermal Drug Delivery System).	2
Figura 2 Estructura de la piel. A la derecha de la imagen se diferencian las capas que componen el tegumento: Epidermis, dermis y capa subcutánea o hipodermis. También quedan reflejadas estructuras como las glándulas sudoríparas y sebáceas, folículos pilosos, vasos sanguíneos, nervios y células de grasa. Imagen obtenida de Okoro Uchechi et al., 2014. ¹⁰	3
Figura 3 A la derecha de la imagen se pueden ver las subcapas de la epidermis: estrato córneo y epidermis viable. En la zona superior se muestran los caminos de penetración a través del SC: transcelular e intercelular. También muestra los conductos apocrinos y ecrinos, y un folículo piloso. Recorte de la imagen original de (Ita, 2020, p. 10) ⁶	3
Figura 4 Esquema de la estructura del estrato córneo (SC), el cual está formado por corneocitos y lípidos intercelulares. (Okoro Uchechi, 2014) ¹⁰	4
Figura 5 Representación esquemática de las estructuras presentes en la piel y diferentes células. Imagen obtenido del trabajo realizado por Kerstin Wolk: Interleukin-28 and Interleukin-29: Novel Regulators of Skin Biology ¹¹	5
Figura 6 Rutas de permeación a través de la piel. a) obtenido de A. Z. Alkilani et al. 2015 ¹⁴ , b) obtenido de obtenida de Okoro Uchechi et al., 2014. ¹⁰	6
Figura 7 Imagen superior: Ejemplo de un anestésico interactuando con un canal de sodio, imagen original de Local Anaesthetics, University of Reading ¹⁶ . Imagen inferior: A: potencial de acción normal. B: No se alcanza el potencial de acción, 30 mV debido a la acción de la anestesia que bloquea los canales de Na+. Imagen obtenida de Aneskey. ¹⁷	7
Figura 8: Esquema molecular del Clorhidrato de bupivacaína monohidratado ¹⁹ ($C_{18}H_{28}N_2O \cdot HCl \cdot H_2O$, peso molecular 342.9g/mol).	7
Figura 9 Diferentes diseños de apósitos: a) Sistema de reservorio, b) Sistema de matricial, c) Sistema de liberación controlada vía matriz y d) Sistema de difusión controlada mediante mini reservorios. Imagen de M. Allevato (2007) ²⁰	8
Figura 10 Iontoforesis ²¹ Funcionamiento de un apósito transdérmico y el método de iontoforesis.	8
Figura 11 Izquierda ²¹ : Electroporación Derecha ²² : Apósito de micro agujas	9
Figura 12 Imagen de apósitos contra el dolor comerciales, para más información ver el texto. Foto tomada por Manuel Arruebo en un supermercado en EEUU.	9
Figura 13 Montaje de la espectrofotometría UV-VIS. Imagen tomada de Nag S. et al. (2021) ²⁶	12
Figura 14: Extrusora presente en el laboratorio de CIBA.	12
Figura 15 Izquierda: Impresora 3D de los laboratorios del CIBA, en ella se imprimen los parches. Derecha: boquilla extrusora con termistor y cartucho calefactor.	13
Figura 16 Diseño del apósito en CatiaV5.	14
Figura 17 Imagen del apósito en el programa de impresión 3D. Tenía dos capas superpuestas en el que las líneas de relleno forman ángulos de 90°.	15
Figura 18 Efecto de echar HCl 0,1 M a la disolución de los apósitos con fármaco, centrifugar y filtrar en la absorbancia medida con el espectrofotómetro UV-Vis. Se marca la longitud de onda a 261 nm donde se encuentra el máximo donde se mediría la concentración del fármaco.	19
Figura 19 Mezclas físicas a partir de las cuales se elaboraron los filamentos. Izquierda: EuRS100-Bupivacaína, centro: EuRS100 y derecha: PCL-bupivacaína.	19
Figura 20 Espectrograma de dos mezclas físicas diferentes de EuRS100-Bupivacaína, medidas con el UV-Vis, en una disolución de etanol y HCl.	20
Figura 21 Filamentos creados mediante el proceso de extrusión en caliente. Izquierda: EuRS100-Bupivacaína, centro: EuRS100 y derecha: PCL-bupivacaína.	20
Figura 22 Espectroftograma de tres filamentos diferentes de EuRS100-bupivacaína, medidos con el UV-Vis, en una disolución de etanol y HCl 0,1 M.	21
Figura 23 Apósitos elaborados con la impresora 3D. Izquierda: EuRS100-Bupivacaína, centro: EuRS100 y derecha PCL-Bupivacaína	21

Figura 24 Espectrofotograma obtenido del análisis mediante FTIR de una muestra de bupivacaína (azul), una muestra de EuRS100-bupivacaína y otra de EuRS100.	22
Figura 25 Espectrofotograma de 2 apósitos uno de EuRS100-Bupivacaína y otro de EuRS100-solo, medidos con el UV-Vis, en una disolución de etanol y HCl 0,1 M. También se muestra el espectrograma de una disolución de bupivacaína a 200 ppm.	22
Figura 26 Absorción de agua tras 24 horas de inmersión de los apósitos. Los círculos en azul se refieren a los apósitos de EuRS100 sin bupivacaína, los círculos naranjas a los apósitos de PCL con bupivacaína y los grises hacen referencia a los apósitos de EuRS100 con bupivacaína.....	24
Figura 27 Recta de calibrado, calculada a partir de apósitos de EuRS100 disueltos en una disolución de etanol con bupivacaína a diferentes concentraciones conocidas. Las medidas se tomaron en el UV-Vis Jasco a 261 nm es la longitud de onda a la que se apreciaba absorbancia de la bupivacaína. .	25
Figura 28 RC de bupivacaína disuelta en agua. Las medidas se tomaron en el UV-Vis Jasco a 261 nm que es la longitud de onda a la que se apreciaba un máximo de absorción.....	26
Figura 29 RC de disoluciones de bupivacaína en agua a concentraciones entre 0 y 30 ppm. Medidas obtenidas mediante el UV-Vis.....	27
Figura 30 RC de disoluciones de bupivacaína en agua a concentraciones entre 30 y 832 ppm, Medidas obtenidas mediante el UV-Vis.....	27
Figura 31 Liberación de fármaco, a 37°C, de los diferentes apósitos de EuRS100 con bupivacaína.	28
Figura 32 Liberación de fármaco, a 37°C, de los diferentes apósitos de PCL con bupivacaína.....	28
Figura 33 Liberación de fármaco, a 37°C, de los diferentes apósitos de EuRS100 impregnados con bupivacaína.	29
Figura A 1: TGA de la bupivacaína, en atmósfera controlada de aire. Se muestran la curva de la TGA (azul) y la DTG (naranja).	36
Figura A 2: TGA de la levobupivacaína, en atmósfera controlada de aire. Se muestran la curva de la TGA (azul) y la DTG (naranja).	36
Figura A 3: TGA del EuRS100, en atmósfera controlada de aire. La temperatura se muestra, en el eje de abscisas en °C. Se muestran la curva de la TGA (azul) y la DTG (naranja).....	37
Figura A 4: TGA del PEG 400, en atmósfera controlada de aire. La temperatura se muestra, en el eje de abscisas en °C. Se muestran la curva de la TGA (azul) y la DTG (naranja).....	37
Figura A 5: TGA del trietil citrato, TEC, en atmósfera controlada de aire. La temperatura se muestra, en el eje de abscisas en °C. Se muestran la curva de la TGA (azul) y la DTG (naranja).....	38
Figura A 6 TGA del polímero PCL, en atmósfera controlada de aire. La temperatura se muestra, en el eje de abscisas en °C. Se muestran la curva de la TGA (azul) y la DTG (naranja).....	38
Figura A 7: TGA del filamento de EuRS100-bupivacaína, en atmósfera de aire. La temperatura se da en °C. Se muestran la curva de la TGA (azul) y la DTG (naranja).....	39
Figura A 8: TGA del filamento de EuRS100-PEG400 (10 wt.%), TEC (10 wt.%) y bupivacaína, en atmósfera de aire. La temperatura se da en °C. Se muestran la curva de la TGA (azul) y la DTG (naranja). ..	39
Figura A 9: TGA del filamento de EuRS100 TEC (10 wt.%) y bupivacaína, en atmósfera de aire. La temperatura se da en °C. Se muestran la curva de la TGA (azul) y la DTG (roja).	40
Figura A 10: TGA del filamento de EuRS100 PEG400 (10 wt.%) y bupivacaína, en atmósfera de aire. La temperatura se da en °C. Se muestran la curva de la TGA (azul) y la DTG (roja).	40
Figura A 11 Espectro FTIR del filamento de EuRS100-TEC 7 wt.% (verde) comparado con sus constituyentes: espectro del TEC (naranja), espectro del EuRS100 (rojo) y espectro de la bupivacaína libre (azul).	42
Figura A 12 FTIR del filamento de RS-PEG400-Bupivacaína (verde), FTIR del RS100 (rojo), FTIR del PEG400 (morado) y FTIR de la bupivacaína (azul).	43
Figura A 13 FTIR del EuRS100-bupivacaína filamento (verde), FTIR del EuRS100-bupivacaína mezcla física (morado) y FTIR del EuRS100-bupivacaína parche (azul claro). La zona remarcada hace referencia al máximo de absorbancia de la bupivacaína presente en las mezclas.	44
Figura A 14 FTIR del filamento de EuRS100-bupivacaína-TEC 7 wt%. (verde), FTIR del parche de EuRS100-bupivacaína-TEC 7 wt%. (morado), FTIR del EuRS100 (rojo), FTIR de la bupivacaína (negro) y FTIR del TEC (naranja).	45
Figura A 15 FTIR del filamento EuRS100-bupivacaína-TEC-PEG400 10 wt.% (verde), FTIR del TEC (naranja), FTIR del PEG400 (morado) y FTIR de la bupivacaína (azul).	45

Índice de tablas

Tabla 1 Parámetros de temperatura, velocidad de extrusión y peso utilizados para conseguir los filamentos de cada material con un diámetro de 1,75 mm. NA: no aplica.....	14
Tabla 2 parámetros para la impresión de los diferentes apósitos.	15
Tabla 3 Diferentes disolventes estudiados y si disuelven o no el EuRS100 y la bupivacaína.....	18
Tabla 4 Temperaturas de degradación de los diferentes componentes usados para la elaboración de los apósitos.....	23
Tabla 5 Valores usados en el cálculo de la cantidad de bupivacaína adsorbida en cada uno de los diferentes apósitos por el método de impregnación.	24
Tabla 6 Valores de liberación (%) de las tres variantes de apósito estudiadas. Todas las medidas están normalizadas según el valor de liberación tras 7 días de apósitos de EuRS100-bupivacaína	29
Tabla A 1 Temperaturas de degradación obtenidas mediante termogravimetría (TGA) de los diferentes plastificantes	40
Tabla A 2 Temperaturas de degradación obtenidas mediante termogravimetría (TGA) de la bupivacaína, el EuRS100, la mezcla de ambos, y la mezcla de ambos con el trietil citrato (TEC) y el polietilenglicol 400 (PEG400), plastificantes	41

1. Introducción y estado del arte

El presente Trabajo de Fin de Máster se presenta como la continuación de las prácticas realizadas por el alumno, Adrián Tajadura Cubillo, para el máster de Ingeniería Biomédica de la Universidad de Zaragoza¹, llevadas a cabo en los laboratorios del CIBA (Centro de Investigación Biomédica de Aragón) y del INMA (Instituto de Nanociencia y Materiales de Aragón) con los recursos allí disponibles.

El tratamiento del dolor es complejo debido a que algunos de los fármacos más utilizados como los antiinflamatorios no esteroideos o las anestésicas de carácter local, tienen efectos secundarios no deseados. La industria farmacéutica ha comercializado diversos dispositivos medicados de uso tópico que eluden la vía intravenosa u oral, y por tanto, buena parte de tales efectos. En la actualidad, algunos de esos apósitos son diseñados mediante impresión 3D, importante innovación tecnológica que simplifica el proceso de producción facilita la personalización y adecuación del producto a las necesidades del paciente, y reduce costes. Con ella se obtienen niveles de calidad equivalentes o mayores a los de los fabricados con técnicas convencionales. Este trabajo describe un método novedoso de fabricación de apósitos de uso tópico para el suministro de anestésicos locales como tratamiento del dolor neuropático, mediante impresión 3D, FDM (modelado por deposición fundida). La novedad del método propuesto radica en que antes de fabricar los filamentos con los que se imprimen después los apósitos, se mezclan el biomaterial o polímero, y el principio activo o fármaco. En el método más común, primero se fabrican los apósitos, y, posteriormente, se les impregnan con el fármaco. Con el método objeto del estudio se pretende demostrar que los apósitos así fabricados contienen una cantidad mayor de fármaco, y, además, son capaces de liberarlo de forma sostenida, en vez de forma abrupta.

El trabajo describe las técnicas, instrumentos y métodos utilizados, así como los resultados obtenidos en los estudios prueba-error realizados para diseñar dos tipos de apósitos por impresión 3D utilizando la técnica de FDM. Unos de ellos se imprimieron a partir de una mezcla de polímero termoplástico y fármaco, para la posterior extrusión e impresión con el filamento creado. Mientras que los otros apósitos se imprimieron sólo con el termoplástico para posteriormente impregnarlo sumergiéndolo en una disolución saturada del fármaco. Además, el trabajo compara el nivel de eficiencia en la liberación del fármaco de cada una de esas dos variantes de apósitos como son: la permanencia del fármaco en los apósitos, es decir, la cantidad de fármaco que contiene cada uno; y el perfil de liberación: cantidad de fármaco liberado y el tiempo que tarda en liberarse.

Durante las prácticas del máster se abordó tanto la selección del polímero y del fármaco, como la determinación de los parámetros óptimos para la extrusión de los filamentos, ya que se usó la técnica de modelado por deposición fundida (FDM), y para la impresión 3D de los apósitos. El polímero seleccionado fue el Eudragit® RS100 (EuRS100), por tener propiedades como: ser imprimible, no ser tóxico, mucoadhesivo, y ser pH-independiente, degradarse por erosión lentamente, lo cual facilita la liberación sostenida del fármaco contenido en él¹. El fármaco escogido fue la bupivacaína hidrosoluble. También se hicieron las pruebas de caracterización de los polímeros mediante las técnicas de análisis termogravimétrico (TGA) y transformada de Fourier infrarroja (FTIR), con el fin de verificar que, tras el proceso de fabricación, en los apósitos aun había fármaco y éste no se había degradado¹. Como con el FTIR no se consiguió verificar la presencia de la bupivacaína, debido a la poca cantidad del fármaco presente en un apósito en comparación con la cantidad de EuRS100, se usó la caracterización por espectrometría ultravioleta visible (UV-Vis).

1.1 Los polímeros de Eudragit® y la policaprolactona

Los polímeros de Eudragit® se utilizan en la industria farmacéutica como medios para encapsular diversas sustancias, ya sea para administrarlas por vía gástrica o tegumentaria, debido a su alta

Adrián Tajadura Cubillo

capacidad para cargar fármacos y su buena tolerancia por parte de la piel². Por vía gástrica se usan principalmente como materiales gastroprotectores para proteger el principio activo de la degradación gástrica, facilitando su liberación en el intestino; y por vía tegumentaria, se aplican para liberar principios activos por vía tópica o transdérmica dada su mucoadhesividad.

Los polímeros de Eudragit® son poliacrilatos sintéticos. Se caracterizan por ser polímeros amorfos no biodegradables, no absorbibles y no tóxicos³. De acuerdo con Evonik Industries AG (su fabricante), todos los tipos de Eudragit® tienen propiedades termoplásticas, temperaturas de transición vítrea bajas, entre 9 °C y algo más de 160 °C; alta estabilidad térmica y buena miscibilidad con varios excipientes de uso farmacéutico⁴. Gracias a estas características se pueden usar para su extrusión en caliente y así generar los filamentos que se utilizan en la impresión 3D de los apósitos. El tipo de liberación se determina según sus grupos funcionales. El EuRS100 utilizado en este estudio se usa para conseguir liberaciones sostenidas a lo largo del tiempo. Es insoluble en agua y no dependen del pH del medio para su liberación³.

La policaprolactona, PCL, es un polímero semicristalino biodegradable y elástico. Debido a su baja cinética de degradación⁵, puede ser buen vehículo para la liberación sostenida de fármacos a largo plazo. Es uno de los polímeros más utilizados en la impresión 3D debido a su baja temperatura de fusión (60 °C) y a su flexibilidad.

1.2 La piel como medio de administración de fármacos y la estructura cutánea

La piel es el órgano más grande del cuerpo. Entre sus funciones destaca la de barrera contra agentes externos ya sean químicos, biológicos o físicos⁶. Aunque es una capa protectora, hay ciertas sustancias capaces de permearla. Esto se debe a su carácter lipídico. Por esta razón la piel se estudia como vía no invasiva de administración de fármacos.

Estos fármacos pueden tener un propósito sistémico o local⁷. Es decir que la administración de fármacos puede hacerse por vía tópica (DDDS) o vía transdérmica (TDDS). En el primer caso, los fármacos tienen una incidencia local, actúan paliando únicamente patologías de la piel o músculos, sin llegar a la circulación sanguínea. La vía transdérmica implica la liberación de un fármaco sistémicamente, es decir, desde la piel hasta el sistema circulatorio.

En los últimos años la administración de fármacos a través de la piel está siendo una idea muy desarrollada debido a las muchas ventajas que ello conlleva. Unas de ellas es que se evitan los inconvenientes de la administración oral como son la degradación de los fármacos en medios ácidos como en el estómago (entorno a pH 1.5-3.5), o el metabolismo de estos en el hígado antes de que lleguen a la circulación sistémica, lo que se denomina *first pass effect*. Evitando este efecto, aumenta la biodisponibilidad del fármaco, y por tanto, disminuye la cantidad necesaria del mismo y se reducen los posibles efectos secundarios⁸.

En la Figura 1 se muestran las dos vías, citadas previamente, de administración de fármacos, TDDS y DDDS.

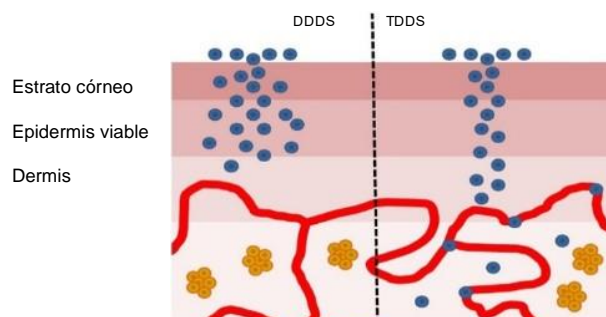


Figura 1 Izquierda: liberación tópica. Derecha: liberación transdérmica. Imagen obtenida de R. Muzzalupo et al.⁹ DDDS: siglas en inglés de sistema dérmico de administración de fármacos (Dermal Drug Delivery System). TDDS: siglas en inglés de sistema transdérmico de administración de fármacos (Transdermal Drug Delivery System).

El tegumento está compuesto por tres capas principalmente. La epidermis, la dermis y la hipodermis o capa subcutánea, ver la Figura 2. El análisis de sus características ayudará a prever su comportamiento en el estudio que se va a realizar.

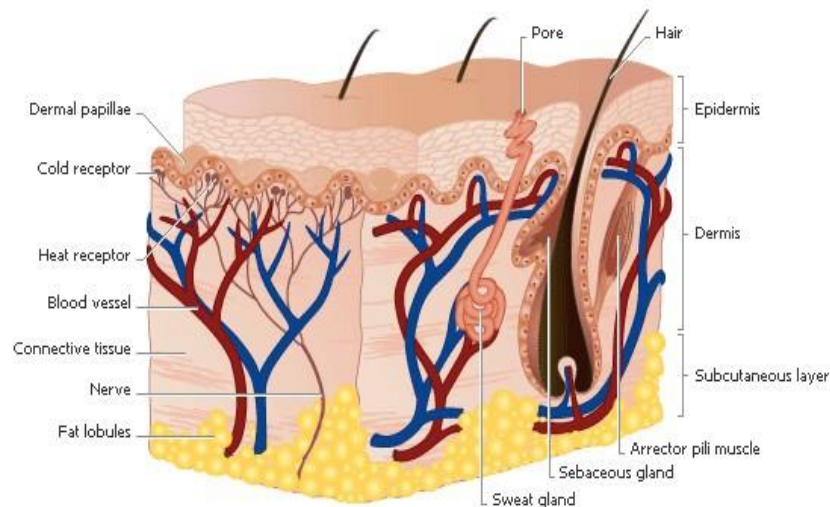


Figura 2 Estructura de la piel. A la derecha de la imagen se diferencian las capas que componen el tegumento: Epidermis, dermis y capa subcutánea o hipodermis. También quedan reflejadas estructuras como las glándulas sudoríparas y sebáceas, folículos pilosos, vasos sanguíneos, nervios y células de grasa. Imagen obtenida de Okoro Uchechi et al., 2014.¹⁰

a. Epidermis:

La epidermis es la capa más externa de la piel. A su vez se puede dividir en dos subcapas: el estrato córneo (SC) y la epidermis viable, ver Figura 3. Los tipos celulares presentes en la epidermis son mayormente queratinocitos, pero también se pueden encontrar células de Merkel, melanocitos y células del sistema inmune como mastocitos o células de Langerhans¹¹ (Figura 5). Los queratinocitos producen queratina, los melanocitos melanina y los dos últimos forman la barrera inmune ante patógenos (Ita, 2020). La función de las células de Merkel es la de participar en el sentido del tacto.

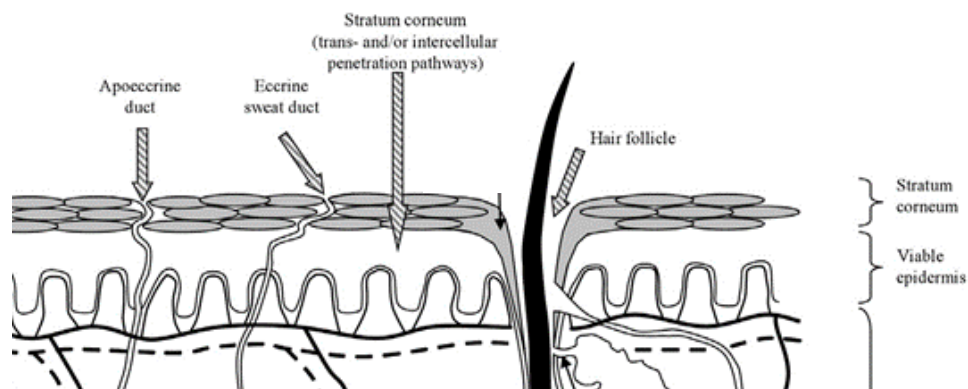


Figura 3 A la derecha de la imagen se pueden ver las subcapas de la epidermis: estrato córneo y epidermis viable. En la zona superior se muestran los caminos de penetración a través del SC: transcelular e intercelular. También muestra los conductos apocrinos y ecrinos, y un folículo piloso. Recorte de la imagen original de (Ita, 2020, p. 10)⁶.

El SC es la capa encargada de conferir a la piel impermeabilidad. Lo consigue gracias a su estructura, está formado por lípidos intercelulares y corneocitos (queratinocitos diferenciados). Ambos dan forma a una estructura tipo pared de ladrillos (Figura 4) la cual se le atribuye la función de barrera de la piel humana.

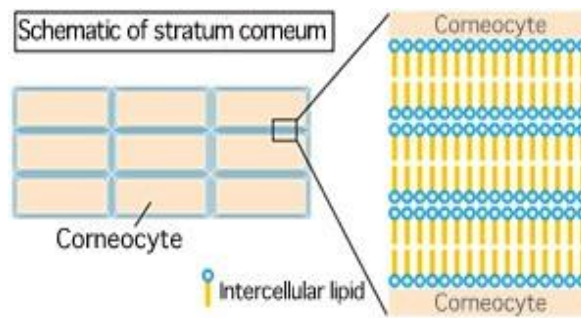


Figura 4 Esquema de la estructura del estrato córneo (SC), el cual está formado por corneocitos y lípidos intercelulares. (Okoro Uchechi, 2014)¹⁰.

Los ladrillos serían los corneocitos mientras que el cemento haría referencia a las bicapas lipídicas, colesterol-ésteres, colesterol, ceramidas y ácidos grasos. Al diferenciarse los queratinocitos en corneocitos se secretan lípidos en forma de gel en la región intercelular dando lugar a una barrera para la difusión⁶. El SC se podría decir que está compuesto por varias capas de corneocitos embebidos en lípidos, habiendo entre dos corneocitos unas 10 bicapas lipídicas. En total, el SC consta de 10-15 capas de corneocitos con un grosor total de entre 10 y 40 micrómetros⁶.

La epidermis viable tiene un espesor de unos 50-100 micrómetros. Está situada debajo del SC. Está compuesta por queratinocitos, lípidos: 15-20%, agua: 40%, proteínas: 40%.

b. Dermis:

Situada bajo la epidermis se encuentra la dermis. Está compuesta por una proteína fibrilar estructural llamada colágeno y por elastina (70% y 4%, respectivamente). Su función es la de soportar la carga ejercida sobre la piel. Posee un grosor que varía entre 0,5 y 5 mm. La dermis contiene fibroblastos, macrófagos, mastocitos, redes nerviosas, vasculares y linfáticas. Además, están presentes compuestos como glicoproteínas, proteoglicanos y ácido hialurónico, que, entre otros, forman la matriz extracelular. Morfológicamente está formada por dos capas: la superior o dermis papilar (tejido conectivo conjuntivo laxo, más densa en células que en fibra; espesor de 100-200 micras) y la capa inferior o dermis reticular (tejido conectivo conjuntivo denso, menos células y más fibras de colágeno).

c. Hipodermis:

Es la capa más profunda de la piel. Es rica en tejido adiposo. Una de sus funciones es la de preservar el calor corporal, y actuar como reservorio de energía y fluidos. En esta capa se pueden encontrar nervios cutáneos, vasos linfáticos y sanguíneos.

d. Otras estructuras importantes en la piel:

La piel también contiene otras estructuras como glándulas sudoríparas, sebáceas o folículos pilosos (FP). Los FP y las glándulas tienen epidermis en primera capa de piel.

La Figura 5 muestra un esquema genérico del sistema tegumentario, se muestran tanto la estructura tegumentaria, como las diferentes células que la componen.

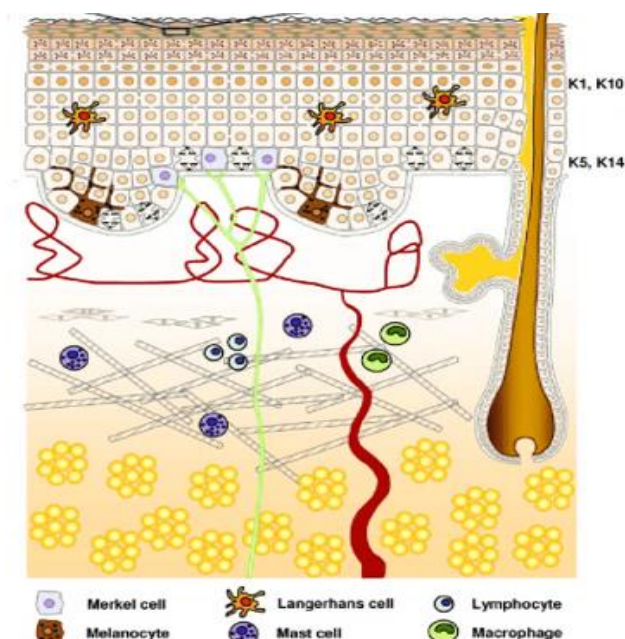


Figura 5 Representación esquemática de las estructuras presentes en la piel y diferentes células. Imagen obtenido del trabajo realizado por Kerstin Wolk: Interleukin-28 and Interleukin-29: Novel Regulators of Skin Biology¹¹.

En aplicaciones transdérmicas, tras aplicar un fármaco por vía tegumentaria este debe difundir por el SC, entrar en la epidermis viable y la dermis para poder ser absorbido por el sistema a través de los capilares sanguíneos presentes en la dermis⁸. Sin embargo, hay varias vías hasta que el fármaco llega a los capilares.

1.3 Transporte de sustancias a través de la piel

Los lípidos hidrofóbicos del SC impiden que la mayor parte de los fármacos aplicados sobre la piel pasen a través de ella, a excepción de los liposolubles o de bajo peso molecular.

Los fármacos se mueven libremente dentro del espacio intercelular y las tasas de difusión se rigen por el grado de lipofiliidad de los diferentes fármacos. Para que un fármaco pueda ser administrado por vías tegumentarias, debe cumplir las siguientes condiciones: tener bajo peso molecular (menor a 500 Dalton), ser liposoluble, no irritar la piel y utilizar una dosis baja.^{8,12,13} Además habrá que evitar que los fármacos se degraden prematuramente por enzimas de la epidermis tras el paso del SC^{8,13}.

El suministro de fármacos a través de la piel, en aplicaciones transdérmicas, es un proceso que sigue las siguientes fases:

- La penetración, el fármaco entra en una de las capas de la piel.
- La partición del fármaco en el SC hacia la epidermis viable, la cual es más acuosa.
- La difusión del fármaco por esta capa hacia las capas superiores de la dermis.
- La permeación. El fármaco pasa de la dermis papilar a la dermis reticular y es captado por la circulación sistémica.
- Y la absorción por la circulación sistémica¹⁴.

Sin embargo, en caso de apósitos de uso tópico, el suministro del fármaco se limita a las tres primeras fases, sin llegar a ser absorbida por la circulación sistémica.

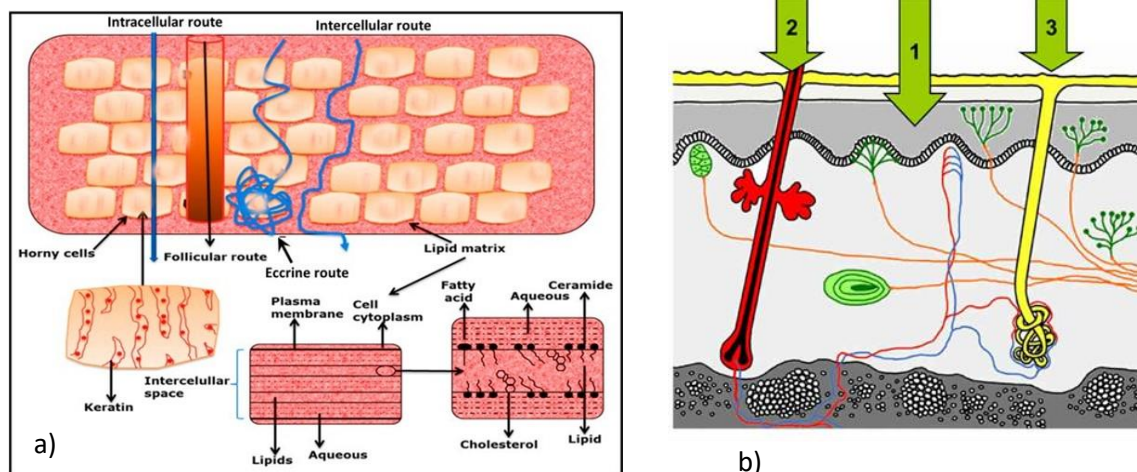


Figura 6 Rutas de permeación a través de la piel. a) obtenido de A. Z. Alkilani et al. 2015¹⁴, b) obtenida de obtenida de Okoro Uchechi et al., 2014.¹⁰

A su vez, Uchechi et al.¹⁰, describen tres principales rutas de permeación de un fármaco a través de la piel:

- Ruta intercelular (flecha 1 de la Figura 6 b)), lípidos: las zonas interlamelares en el SC tienen lípidos menos ordenados y cadenas hidrofóbicas más flexibles. Los lípidos fluidos en la barrera de la piel son cruciales para la difusión a través de esta de moléculas lipídicas y anfipáticas. Las cuales ocupan los espacios para su posterior migración a través de los lípidos intercelulares.
- Penetración folicular y rutas glandulares (flechas 2 y 3 de la Figura 6 b)). Las glándulas ecrinas y apocrinas y los folículos pilosos suponen el 0,1 % de la superficie, pero son una ruta de fácil penetración ya que partículas pequeñas, como las nanopartículas, tienden a acumularse en esas áreas.
- Difusión transcelular: no es muy importante. Las zonas de pocas células y pocos paquetes intercelulares de lípidos ofrecen menos resistencia al paso de sustancias hidrofílicas. Se da entre clústeres de corneocitos no superpuestos.

1.4 Funcionamiento de las anestésicos locales

Las anestésicos locales bloquean, de forma reversible y transitoria, la transmisión del impulso nervioso que va desde los nervios hasta los centros de detección del dolor, nociceptores, situados en el sistema nervioso central.

Entre el interior y el exterior de las neuronas, separadas por la membrana neural, hay una diferencia de potencial de unos -90 mV. Al recibir un estímulo, se abren los canales de Na⁺ dejando pasar el ion Na⁺, de manera que se positiviza la neurona y se genera un potencial. Superado un límite se genera un impulso, el cual se transmite de neurona a neurona. Al terminar el proceso, se abren canales de K⁺ dejando salir el ión K⁺ y por tanto negativizando el nervio, ayudando a llegar al equilibrio, -90 mV, repolarizándose la membrana¹⁵. Al unirse las moléculas de la anestesia a los canales iónicos de las membranas de las células nerviosas los bloquean, por lo que el impulso nervioso no se transmite y no se siente el dolor¹⁶, ver Figura 7.

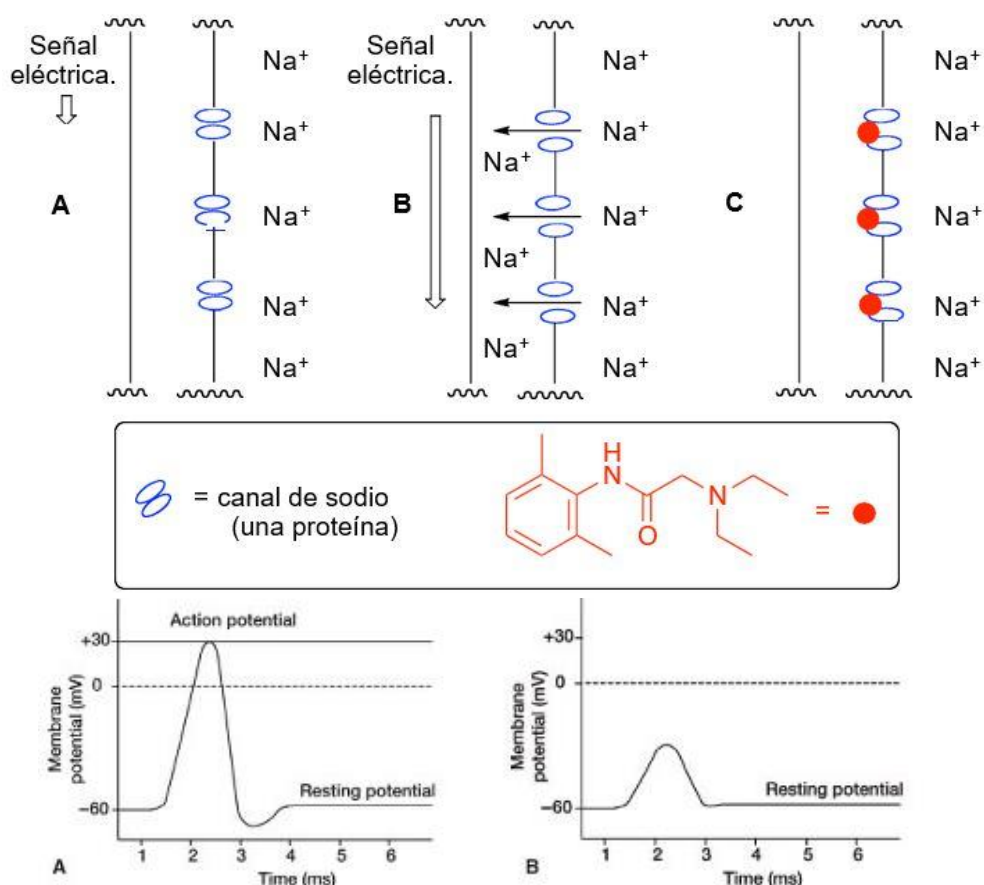


Figura 7 Imagen superior: Ejemplo de un anestésico interactuando con un canal de sodio, imagen original de *Local Anaesthetics, University of Reading*¹⁶. Imagen inferior: A: potencial de acción normal. B: No se alcanza el potencial de acción, 30 mV debido a la acción de la anestesia que bloquea los canales de Na⁺. Imagen obtenida de *Aneskey*.¹⁷

En este trabajo se planteó utilizar la bupivacaína hidrosoluble (clorhidrato de bupivacaína monohidratado) como anestesia local para mitigar el dolor. Ya que es uno de los anestésicos con mayor tiempo de actuación¹⁸. En la Figura 8 se puede ver la estructura molecular del compuesto.

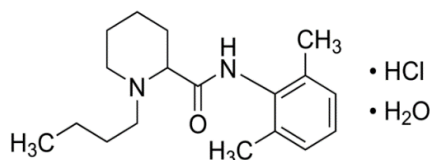


Figura 8: Esquema molecular del Clorhidrato de bupivacaína monohidratado¹⁹ ($C_{18}H_{28}N_2O \cdot HCl \cdot H_2O$, peso molecular 342.9g/mol).

1.5 Sistemas para la liberación controlada de fármacos

En la actualidad, existen dos tipos de apósitos para conseguir liberar fármaco a través de la piel: los apósitos de uso tópico y transdérmico. Ambos son sistemas multicapa consistentes en tres partes fundamentales: adhesivo, principio activo y potenciadores de la permeación. Para los apósitos de uso tópico no será necesario el uso de potenciadores y la cantidad de fármaco necesaria será menor, ya que el objetivo es que actúe localmente, sin llegar a la circulación sistémica.

Hay diferentes tipos de diseños para la liberación controlada de fármacos²⁰ (ver Figura 9):

- Sistemas de reservorio o sistema controlado de permeación a través de una membrana porosa de permeación selectiva.

- Sistemas matriciales: están constituidos por un disco polimérico hidrofílico o hidrofóbico, en el cual está uniformemente dispersado el fármaco. El entramado del polímero controla la liberación del fármaco.
- Sistema de difusión controlada vía matriz en los que los principios activos están dispersos en la matriz de polímero, y situados bajo un disco de material impermeable y oclusivo. La liberación está controlada por la matriz polimérica.
- Sistema de difusión controlada mediante micro reservorios.

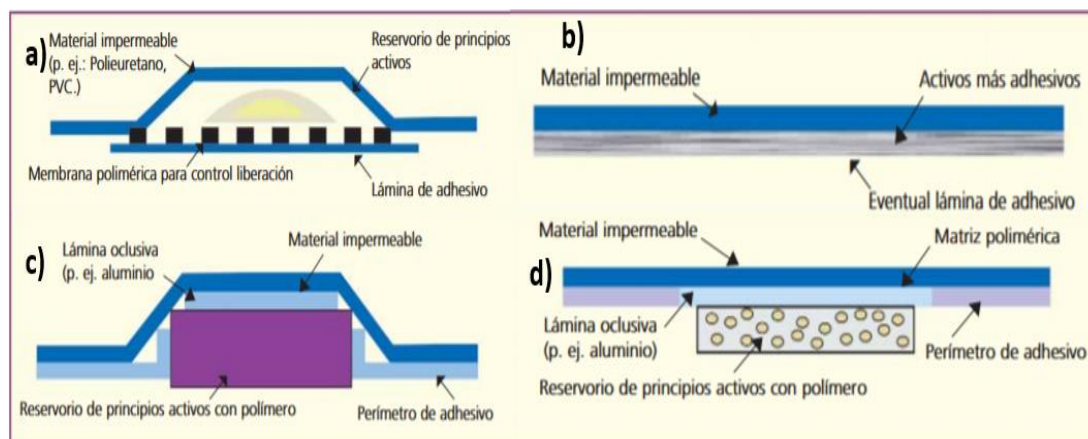


Figura 9 Diferentes diseños de apósitos: a) Sistema de reservorio, b) Sistema de matricial, c) Sistema de liberación controlada vía matriz y d) Sistema de difusión controlada mediante mini reservorios. Imagen de M. Allevato (2007)²⁰.

Otra de las diferencias en el diseño de los diferentes apósitos es la manera que tienen de potenciar que el fármaco atraviese las diferentes capas de la piel, siendo el SC la capa más impermeable. Se recogen aquí tres métodos diferentes para potenciar la penetración del fármaco:

- La iontoforesis²¹. En el ejemplo de la Figura 10 se muestra el caso de un apósito transdérmico en forma de reservorio en el que se coloca un fármaco cargado. Sobre este reservorio se coloca un electrodo con el mismo tipo de carga (positivo o negativo). En otro punto se coloca un segundo electrodo con carga opuesta para que se genere un campo eléctrico que ayude a la penetración del fármaco, el cual, por electro-osmosis, llegaría a su destino.

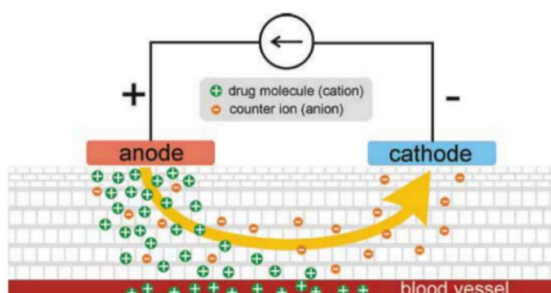


Figura 10 Iontoforesis²¹ Funcionamiento de un apósito transdérmico y el método de iontoforesis.

La electroporación²¹: mediante estímulos eléctricos se consigue aumentar el espacio entre los corneocitos del SC y por tanto aumenta la permeabilidad del fármaco. La corriente eléctrica ha de ser de alto voltaje y poca duración para desestabilizar las bicapas lipídicas de las células, haciéndolas permeables a sustancias hidrofílicas. Siempre y cuando no se supere un valor de intensidad, este efecto es transitorio y en el momento que se deje de aplicar el estímulo volverán a su estado natural. Esto permitirá que el fármaco de un apósito penetre con mayor facilidad.

Un esquema del funcionamiento de este método se puede ver en la imagen de la izquierda de la Figura 11.

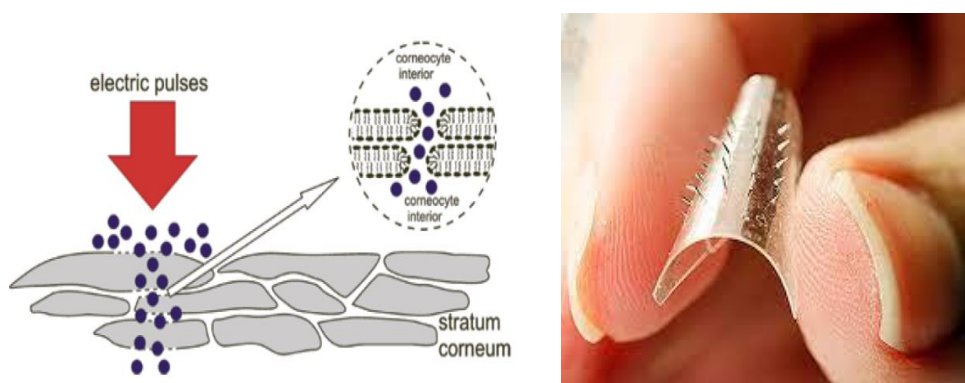


Figura 11 Izquierda²¹: Electroporación Derecha²²: Apósito de micro agujas

b. Apósitos de micro agujas, mostrados en la imagen de la derecha de la Figura 11. Este tipo de apósitos sirven como conductos para liberar el fármaco una vez traspasado el SC con las agujas²¹. Como el diámetro de las micro agujas es de unos cientos de nanómetros, y su longitud no supera los 2 mm, son mínimamente invasivos y no producen dolor estando especialmente recomendados para ancianos y niños²³. En la actualidad este método se utiliza sobre todo para apósitos transdérmicos. Su diseño está variando mucho dependiendo la forma de las agujas, y del tipo de materiales que las recubren.²³

1.6 Apósitos comerciales

En el mercado actual se pueden encontrar apósitos tópicos liberadores de fármaco como los mostrados en la Figura 12. Una de las distribuidoras que se dedica a su comercialización es Walgreens (<https://www.walgreens.com/>), que tiene apósitos de diferentes fabricantes para el tratamiento del dolor. En ellos se utilizan principios activos como la lidocaína (4%), la capsaicina (0,025%), el salicilato de metilo (10%). Alguno de esos apósitos mezcla un fármaco con mentol para generar una sensación de frío en la zona a tratar, minimizando la sensación de dolor. El prospecto de la mayor parte de estos apósitos recomienda el uso de un apósito entre 8 y 12 horas.



Figura 12 Imagen de apósitos contra el dolor comerciales, para más información ver el texto. Foto tomada por Manuel Arruebo en un supermercado en EEUU.

2. Objetivos del estudio

El objetivo general del trabajo es el diseño de apósitos tópicos, mediante impresión 3D FDM, para el suministro de anestésicos locales como tratamiento del dolor neuropático, que sean capaces de liberar, de manera sostenida en el tiempo, un anestésico local que forma parte de la composición de los filamentos con que se elaboran dichos apósitos. La novedad del método propuesto radica en que los filamentos se fabrican a partir de la mezcla de un polímero termoplástico con un fármaco antes del proceso de extrusión-impresión de tales apósitos, de modo que el fármaco forma parte de la propia estructura, y su liberación puede tener lugar paulatinamente, a medida que se van erosionando. En el método más convencional, en cambio, los apósitos se imprimen, y, posteriormente, se impregnan con el principio activo.

Objetivo específico de este estudio es comparar la eficiencia de carga y liberación del fármaco de cada tipo de apósito diseñado con el método convencional y con el novedoso propuesto en el estudio. Tal eficiencia se pretende medir a partir de dos parámetros: la cantidad de fármaco que contiene cada uno; y el perfil de liberación, cantidad de fármaco liberado y el tiempo que dura esa liberación. Se planea medirla mediante la espectroscopía de luz ultravioleta-visible (UV-Vis). Se espera demostrar que los apósitos de nuevo diseño pueden contener una cantidad mayor de fármaco que con el método convencional, y que, además, van a ser capaces de liberarlo de manera progresiva.

Durante el desarrollo del estudio surgió un objetivo secundario: comprobar cómo el tipo de polímero seleccionado para la elaboración de la mezcla con la que se fabrican los apósitos influye en la funcionalidad de los mismos. Este objetivo se llevó a cabo elaborando con el método novedoso dos apósitos compuestos por polímeros diferentes: Eudragit® RS100 (EuRS100) y la policaprolactona (PCL), respectivamente.

3. Técnicas, instrumentos, y métodos de caracterización

3.1 Técnicas e Instrumentos

3.1.1 FTIR: Transformada de Fourier infrarroja

Se utilizó esta técnica porque se emplea habitualmente en la caracterización de diferentes compuestos para identificar los grupos funcionales presentes en las muestras. Además, como permite reflejar las vibraciones características de los enlaces entre átomos, con ella se caracteriza la estructura de las muestras¹.

El fundamento de esta técnica son los cambios energéticos que se producen en las moléculas por la transición de un estado de energía a otro cuando estas son irradiadas con un haz de luz infrarroja. Cuando la muestra es atravesada por el haz, se registra la cantidad de energía absorbida a cada longitud de onda. Mediante la transformada de Fourier se miden todas las longitudes a la vez. Con estos datos se traza un espectro de transmitancia o absorbancia que refleja a qué longitudes de onda la muestra absorbe energía. Posteriormente se interpreta el espectro para conocer los enlaces presentes.

En este trabajo se utilizó el espectrómetro Vertex 70 de Bruker. Además, tenía una pieza accesoria, la ATR Golden gate que se usa para muestras muy absorbentes o gruesas, las cuales suelen producir picos intensos si se miden mediante la transmisión. Todo ello presente en el laboratorio del INMA.

3.1.2 TGA: Termogravimetría

El análisis termogravimétrico se usa para caracterizar materiales enfocándose en su composición. Con esta técnica se caracterizan tanto las propiedades químicas como físicas de los materiales en función de la temperatura, en una atmósfera controlada. Conforme va aumentando la temperatura se van registrando los cambios en la masa de la muestra dando lugar a la curva de la TGA. Esta pérdida de masa se puede atribuir tanto a la pérdida de humedad como a la eliminación de agentes estructurales orgánicos. Posteriormente se hace la derivada de dicha curva para obtener la TGA diferencial que muestra el cambio en la masa de la muestra y donde se observan claramente las temperaturas de máxima variación. Es un tipo de ensayo destructivo ya que la muestra queda desnaturalizada por las altas temperaturas a las que es sometida.

En este caso se utilizó un analizador térmico TA Instrument Q5000 del INMA. Las medidas se hicieron en una atmósfera controlada de aire. El aumento de temperatura se hizo siguiendo una rampa desde temperatura ambiente hasta los 800 °C, manteniendo esta temperatura máxima 3 minutos, a razón de 10 °C/min.

3.1.3 La Espectrofotometría Ultravioleta-Visible (UV-Vis):

El espectrofotómetro es un dispositivo usado para realizar espectrometrías de absorción en parte de la región ultravioleta y en todas las regiones adyacentes del campo electromagnético. La cantidad de absorción o reflexión depende directamente del color que se observa y este está relacionado con la sustancia química presente a analizar. Este tipo de espectrometría mide la transición de los electrones que componen la muestra. Esta transición se da cuando una molécula absorbe radiación ultravioleta-visible generando la transición de un electrón de un estado basal de energía a otro excitado. La absorbancia está relacionada linealmente con la concentración del analito (siempre y cuando la medida sea inferior a 1) según la ley de Beer-Lambert²⁴. La Figura 13 muestra un esquema del funcionamiento del UV-Vis.

Los datos de absorbancia del UV-VIS se obtuvieron en el laboratorio del INMA usando un espectrofotómetro de la casa JASCO, modelo V-670, a temperatura ambiente. El espectrofotómetro lo componen: una fuente de luz, dos soportes sobre los que se colocan las dos cubetas (la de referencia y la muestra). Este espectrofotómetro tiene la característica de poder medir, en un solo escaneo, todo el rango UV y el NIR (infrarrojo cercano). Su rango de medición va desde 190 nm hasta los 2700 nm.²⁵

Las muestras se vertieron en las cubetas de cuarzo, y estas se colocaron en los soportes, los cuales estaban en una cámara cerrada y oscura para evitar la entrada de la luz ajena a la fuente. Los datos fueron recogidos en el rango de longitud de onda comprendido entre 220 nm y 350 nm a razón de 200 nm por minuto.

Para la primera medida se llenaron las dos cubetas con la misma disolución y se hizo una medida que serviría como línea base. Las siguientes medidas se hicieron dejando una cubeta de referencia con la primera disolución y colocando en la otra la disolución-muestra.

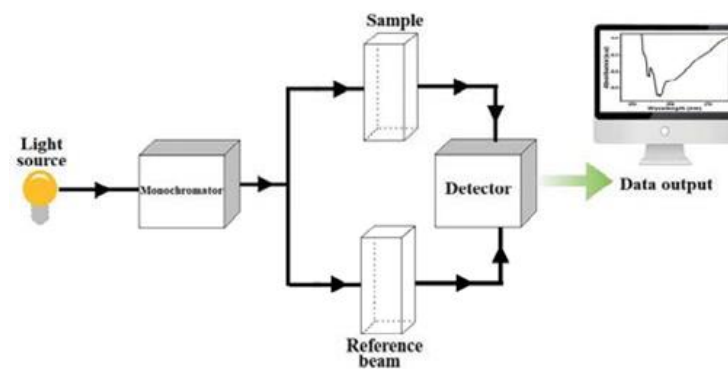


Figura 13 Montaje de la espectrofotometría UV-VIS. Imagen tomada de Nag S. et al. (2021)²⁶.

3.1.4 La extrusión y la impresión 3D

La extrusión es un proceso de mecanizado en el que un material fundido es forzado a fluir a través de un orificio, por compresión, para proporcionar un filamento alargado a través de la acción giratoria de un tornillo sinfín.

La extrusora presente en el laboratorio del CIBA no es comercial, sino una diseñada y fabricada en la Universidad de Zaragoza, se muestra en la Figura 14. El funcionamiento de la extrusora es el siguiente: En primer lugar, se selecciona en la pantalla electrónica la temperatura deseada, temperatura de fusión del material, y la velocidad de trabajo del tornillo sinfín. La extrusora contaba con tres termistores, situados en diferentes puntos de la cámara extrusora, para poder calentar progresivamente la mezcla hasta que esta alcanzara la temperatura de fusión justo antes de ser extruida. Alcanzadas las temperaturas preestablecidas, se introduce el material poco a poco en cámara de extrusión donde se va calentando hasta fundirse, y es además comprimido por el tornillo contra la base inferior de la cámara hasta forzar su salida por un orificio que, en este caso, es de 1.75mm de diámetro. Poco a poco el filamento es extruido. Según el tipo de material que se extruye puede necesitarse colocar un peso y un sistema de enfriado para evitar el engrosamiento del filamento mientras sale.



Figura 14: Extrusora presente en el laboratorio de CIBA.

La impresión 3D o fabricación aditiva es un proceso por el cual se fabrican objetos físicos mediante la superposición de capas de material a partir de modelos digitales (CAD). Hay muchos tipos de impresión 3D. En este caso es del tipo FDM, que consiste en la deposición de material termoplástico fundido sobre una base mediante un extrusor. La impresora utilizada está basada en el diseño de hardware libre Prusa i3, Figura 15.

Su funcionamiento es el siguiente: en primer lugar, hay que calibrarla para que la distancia entre la boquilla y la base de impresión sea la mínima sin que haya contacto entre ellas; así se favorece la deposición de las capas del material, y se evita imprimir fuera de la cama. Después, se alimenta la impresora con el correspondiente filamento y se ejecuta el programa diseñado para imprimir cada apósito. Este programa (en formato libre, *gcode*) se edita previamente con un software de diseño que permite ajustar, en cada caso, parámetros como la temperatura impresión, la velocidad de impresión y de movimiento, la altura de capa o la temperatura de la cama de impresión.

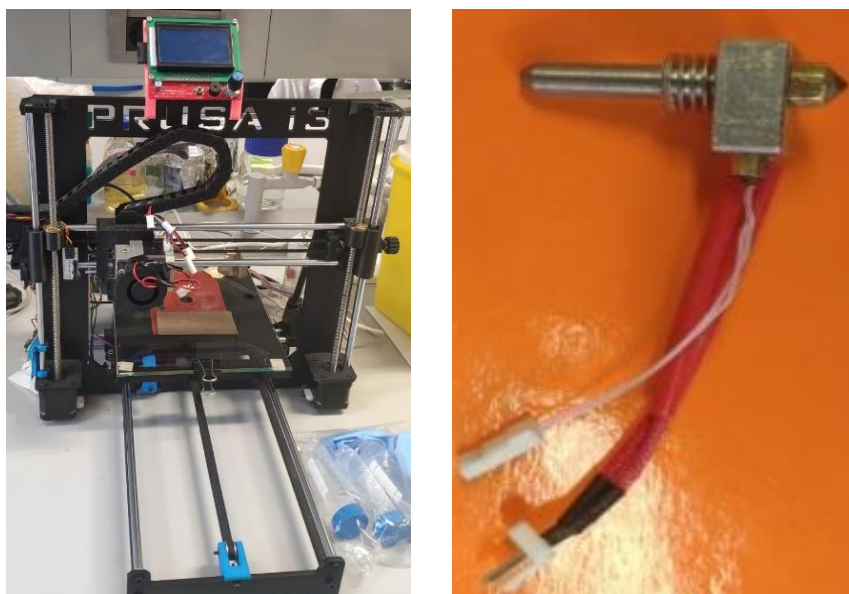


Figura 15 Izquierda: Impresora 3D de los laboratorios del CIBA, en ella se imprimen los parches. Derecha: boquilla extrusora con termistor y cartucho calefactor.

3.2 Métodos y materiales

3.2.1 Preparación de las mezclas físicas

El procedimiento seguido para la preparación de las mezclas físicas es similar al que describen S. Schilling et al.²⁷ o Chuanbin Wu et al.²⁸.

Para el caso de las mezclas físicas de EuRS100 y las de EuRS100-bupivacaína, se pesaron 5 g de polímero. En el caso de las mezclas físicas con fármaco, se añadieron 50 mg de bupivacaína hidrosoluble. El siguiente paso consistió en disolver la mezcla en acetona a razón de 8 mL de acetona por cada miligramo de polímero. A continuación, se colocaron las mezclas en un bote cerrado sobre una placa de agitación magnética a 600 rpm. Transcurridos 30 minutos se destapó el envase y el disolvente se dejó evaporar durante 24 horas en la misma placa. Al día siguiente se pasó cada mezcla a una placa Petri diferente y se introdujeron en una estufa otras 24 horas a 45 °C. Por último, se sacaron de la estufa y se guardaron hasta su utilización en la elaboración de los filamentos.

En el caso de las mezclas de PCL-bupivacaína, el procedimiento es el mismo salvo que las disoluciones se hicieron con de 2 g de polímero y 20 mg de fármaco, y se disolvieron en 40 mL de acetona. Dado que este polímero tiene menor solubilidad en el disolvente utilizado.

3.2.2 Preparación de los filamentos mediante extrusión en caliente.

En primer lugar, se calentó la cámara de la extrusora hasta la temperatura de fusión de cada mezcla, las cuales quedan recogidas en la Tabla 1. Posteriormente se introdujo cada mezcla y mediante la acción giratoria del tornillo sinfín, se desplazó hacia el orificio del extrusor, forzando su paso y otorgando a la mezcla la forma de filamento. Como el diámetro máximo de cada uno de ellos tenía que ser de 1,75 mm, se comprobaron uno a uno con un *pasa no pasa* (tubo de teflón de 3 cm de longitud y 1,75 mm de diámetro).

En el caso del EuRS100-bupivacaína y EuRS100, los filamentos una vez fuera de la cámara de extrusión aumentaban su diámetro dado que liberaban tensiones generadas por el proceso. Para evitarlo se colocó un peso en el extremo de cada filamento a la vez que caían en una probeta de 1 litro de volumen con agua (sistema de enfriamiento). Antes de que el peso tocara el fondo se cortaban los filamentos y se recuperaba el peso para volver a colocarlo en el nuevo filamento.

Tabla 1 Parámetros de temperatura, velocidad de extrusión y peso utilizados para conseguir los filamentos de cada material con un diámetro de 1,75 mm. NA: no aplica

Disolución	Temperatura de Extrusión (°C)	Velocidad de Extrusión (rpm)	Peso (mg)
EuRS100 + Bupivacaina	130	13	1640
EuRS100	150	13	1640
PCL + Bupivacaína	80	13	NA

3.2.3 Impresión 3D de los apósitos (FDM)

Dado que el EuRS100 es un material duro y algo frágil, tendía a romperse al pasar por la rueda dentada que alimenta la boquilla de impresión. Su impresión se consiguió con la ayuda de PLA (ácido poliláctico). Para ello, de cada filamento fabricado se cortaron secciones de 3,5 cm, longitud comprendida desde la boquilla hasta la rueda dentada del sistema de alimentación. A continuación, se colocó PLA con la finalidad de que empujara al material de los filamentos. Como la temperatura de fusión del PLA es superior a la de los filamentos extruidos, este no se imprime con el apósito.

Por otro lado, para favorecer la adhesión a la cama de impresión y la posterior separación del producto impreso de la base, se utilizó una cama caliente y un trozo de cinta de carroceros de tamaño suficiente como para contener el apósito impreso.

Los apósitos fueron diseñados, utilizando el software CatiaV5 (Figura 16), como una placa maciza rectangular con bordes redondeados y con dimensiones 13 x 17,5 x 0,75 mm.

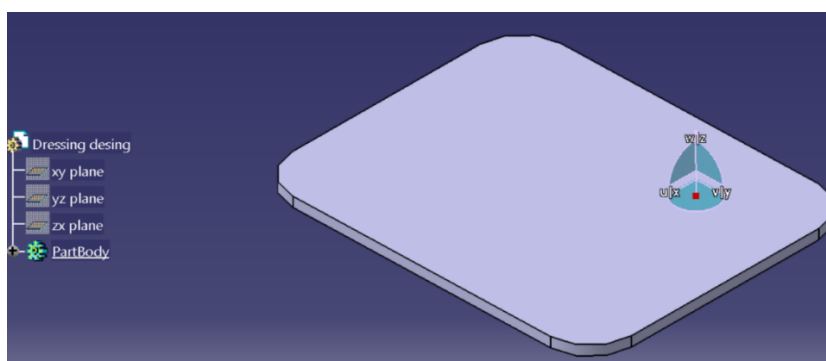


Figura 16 Diseño del apósito en CatiaV5.

Con el Ultimaker Cura se seleccionaron los parámetros de impresión. Se tuvo en cuenta que, algunos de ellos, como temperatura o velocidad, dependen de cada material y no se podían introducir arbitrariamente.

Para favorecer la liberación, la cual se ve aumentada conforme aumenta la superficie de contacto respecto al volumen, se siguió el ejemplo del estudio de 2016 de Yi et al.²⁹ En él se explica el impacto de los factores de diseño en el perfil de liberación. Se intentó maximizar la *ratio superficie de contacto-volumen* para así obtener una mayor liberación del fármaco existente en el apósito²⁹. Con este fin, se eligió una geometría con un patrón en forma de rejilla, con dos capas superpuestas a 90° (Figura 17). Los parámetros de las impresiones fueron (Tabla 2):

Tabla 2 parámetros para la impresión de los diferentes apósitos.

Disolución	Temperatura cama impresión (°C)	Velocidad impresión (mm/s)	Temperatura Impresión °C)
EuRS100 + Bupivacaína	50	60	135
EuRS100	50	60	160
PCL + Bupivacaína	NA	60	80

Para poder separar el apósito de la cama de impresión sin que se rompa, se utiliza una cama calefactada en las impresiones del EuRS100 y EuRS100-bupivacaína ya que estos polímeros son poco flexibles.

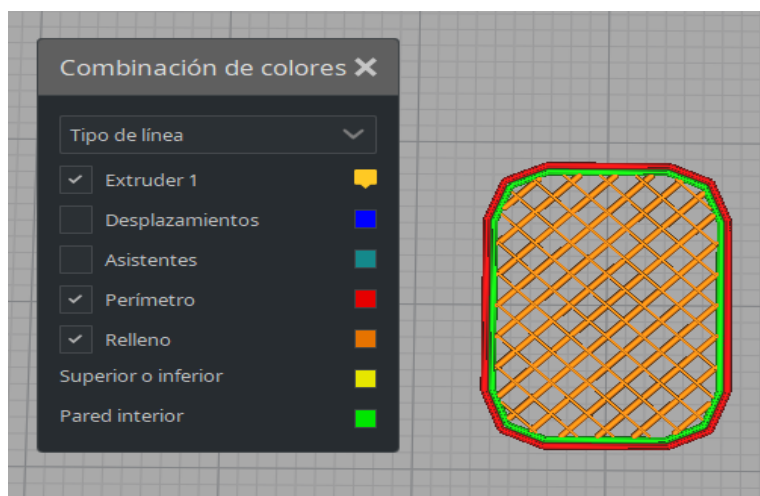


Figura 17 Imagen del apósito en el programa de impresión 3D. Tenía dos capas superpuestas en el que las líneas de relleno forman ángulos de 90°.

Para más información Ir al Anexo 1: Parámetros de impresión.

3.2.4 Absorción de agua

Con este ensayo se pretendía valorar la capacidad de los apósitos para absorber los exudados de la piel. Se siguió un procedimiento similar al descrito por Lavorgna, Piscitelli, Mangiacapra, y Buonocore (2010) que aparece en estudios como el de M. Atef et al.³⁰, el de L. Valencia-Gómez et al.³¹ o el de G. Kiaee et al.³². Procedimiento:

- Se secaron las muestras (20x20 mm) en un desecador conteniendo gel de sílice. Y se pesaron.

- Se sumergieron en 50mL de agua destilada a temperatura ambiente durante el tiempo indicado.
- Se sacaron del envase, se secaron con papel absorbente para quitar el agua adsorbida a la superficie del apósito, y se pesaron.
- Se calculó la cantidad de agua absorbida con la siguiente ecuación:

$$\text{Agua absorbida (\%)} = \frac{\text{Peso del apósito mojado} - \text{Peso del apósito seco}}{\text{Peso del apósito seco}} \times 100$$

3.2.5 Elección del disolvente y precipitado del polímero

La condición necesaria para elegir el disolvente adecuado era que debía disolver simultáneamente tanto el polímero (EuRS100) como el fármaco (bupivacaína hidrosoluble).

Los posibles disolventes valorados fueron: agua, etanol, acetato de etilo, acetona, acetonitrilo, dimetil sulfato (DMSO). Para conseguir precipitar el polímero una vez obtenido el fármaco se probaron el ácido clorhídrico (HCl) y el ácido fórmico.

Para comprobar si los disolventes cumplían la condición se mezclaron por un lado el disolvente y la bupivacaína, y por otro, los disolventes y el polímero. Todas las pruebas se dejaron 60 minutos en un oscilador de rodillos. Si pasado ese tiempo aún no se habían disueltos, se metía la mezcla en un baño con ultrasonidos durante 15 minutos para forzar la disolución. Si aun así seguía sin disolverse, se concluía que el fármaco o polímero eran insolubles en dicho disolvente y este se descartaba.

3.2.6 Estudios de estabilidad térmica de la bupivacaína

Los estudios de la estabilidad térmica de la bupivacaína se hicieron mediante TGAs y mediante el análisis de infrarrojo de Fourier (FTIR). Con la TGA se buscó conocer las temperaturas de degradación de los diferentes polímeros y fármacos que se usarían, y así verificar que no se degradarían durante el proceso de elaboración. Con el FTIR se buscó saber si algún proceso alteraba el compuesto, si interaccionaban entre sí los materiales y si había bupivacaína tras la elaboración de los apósitos.

Debido a que el proceso de elaboración de los apósitos es largo, la bupivacaína permaneció cierto tiempo en el frigorífico en las diferentes etapas de trabajo disuelta en agua, por lo que fue necesario asegurar que no se degradaba. Para ellos se midió durante dos semanas, la misma disolución de bupivacaína en agua con el UV-Vis.

También hubo que comprobar su estabilidad mientras estaba junto con el polímero, ya fuese como filamento, o como componente del apósito. Para ello se midió su presencia en el UV-Vis, tanto en las disoluciones como en los filamentos/apósitos recién elaborados; se repitió esta medición con las muestras guardadas durante un tiempo mínimo de una semana analizando los enlaces químicos presentes en las muestras.

3.2.7 Estudio de liberación

Con este estudio de liberación se pretendía comprobar uno de los objetivos de este trabajo: valorar si con el método aquí descrito, se carga más cantidad de fármaco en el apósito cuando está fabricado mediante impresión 3D donde el fármaco forma parte de su estructura, que cuando es simplemente impregnado con una disolución de fármaco un vez impreso, y este, es capaz de ser liberado de manera controlada en vez de forma abrupta y rápida.

Procedimiento: se dividió cada apósito en partes aproximadamente iguales (en peso) y se le añadieron 1 mL de agua miliQ por cada 10 mg de EuRS100. El sobrenadante del estudio de liberación se midió directamente en el UV-Vis para analizar la presencia del fármaco.

Se hicieron medidas de la cantidad de fármaco que había en el apósito. Para ello se desarrolló un protocolo en el que se disolvían las muestras en un disolvente y luego se precipitaba el polímero para así poder eliminarlo por centrifugación. Era necesario eliminar el EuRS100 ya que su absorbancia se solaparía con la del fármaco, impidiendo la medida de este último.

El disolvente seleccionado fue el etanol y el medio para la precipitación fue añadir una disolución 0,1 M de HCl ya que el polímero es totalmente insoluble en medio ácido.

Protocolo desarrollado para caracterización de muestras sólidas en dispositivo de detección por medio de luz Ultravioleta-Visible (UV-Vis)

- Cada 10 mg de apósito se disuelven en 3,36 mL de etanol puro.
- De esa mezcla se coge 950 μ L y se añaden 50 μ L de HCl 0,1 M (previamente preparados)
- Esta segunda mezcla se agita en una osciladora durante 30 minutos y se centrifuga 10 minutos a 13000 rpm
- Se coge el sobrenadante y se filtra con un filtro de jeringa
- Se mide mediante el UV-Vis

Para medir la liberación en el UV-Vis, y poder calcular el *drug loading*, antes se hicieron unas rectas de calibrado. La línea base de la recta de calibrado se hizo con agua miliQ. Mientras que para calcular el *drug loading*, la línea base de la recta se hizo con etanol y HCl (0,1 M) en las mismas proporciones que las descritas en el protocolo. A continuación, se midieron diferentes disoluciones de la misma mezcla que la línea base con concentraciones de fármaco conocidas.

El procedimiento que se siguió para realizar este estudio se explica a continuación. Se pesaron 3 apósitos de cada material, EuRS100-bupivacaína y PCL-bupivacaína, tres veces, y se calculó la media. Después, esta medida de peso se dividió entre 6 para saber más o menos el peso de los trozos que usarán para este estudio. Debido a la baja flexibilidad de los apósitos era difícil tener muestras con el mismo peso así que se cogieron muestras de peso 6,5 \pm 2,5 mg para los apósitos de EuRS100, y de 10 \pm 2 mg para los de PCL. Se hicieron 8 trozos para tomar 8 muestras diferentes a los tiempos: 1,5, 2, 4, 8, 14,5, 18,5, 20,7 y 41 horas.

También, se hizo un estudio de liberación de los apósitos impregnados de EudragitRS100 tomando muestras a las mismas horas que los otros apósitos.

3.2.8 Impregnación de los apósitos de EuRS100

Una de las técnicas usadas para elaborar los dispositivos medicados es la de fabricarlos primero, y luego, impregnarlos con el principio activo como por ejemplo se hace en D. Psimadas et al.³³ o A. Dorigato et al.³⁴

En el estudio expuesto en este trabajo, se decidieron imprimir unos apósitos fabricados solo con EuRS100 y posteriormente impregnarlos siguiendo los siguientes pasos:

1. Se parte de una disolución muy concentrada de bupivacaína en agua: 400 mg de bupivacaína en 10 mL de agua (40000 ppm)
2. Se cogen 100 μ L de la disolución preparada y se añaden 9,9 mL de agua. De esta manera se tiene una disolución a 400 ppm. Se mide para comprobarlo.
3. Se introducen en recipientes independientes en 3 mL de la disolución a 40000 ppm.

4. Se dejan 24 horas sumergidos en la disolución con un movimiento rotatorio del recipiente.
5. Se sacan los apósitos. Para medir la concentración de la disolución de nuevo, se vuelve a hacer lo mismo que antes, se diluye hasta los 400 ppm teóricos y se vuelve a medir. La diferencia entre ambas mediciones corresponde a la cantidad de bupivacaína adsorbida en los apósitos (método indirecto).
6. Se pesan los apósitos de nuevo para comprobar la absorción del sobrenadante como porcentaje de peso ganado, utilizando la fórmula expuesta en sección 3.2.4 Absorción de agua.

4. Resultados:

4.1 Elección de los disolventes

El disolvente elegido para disolver los apósitos, con el fin de calcular el *drug loading*, fue el etanol ya que fue el que con más rapidez disolvió ambos compuestos por separado. Dato que quedó recogido en el protocolo para la cuantificación del *drug loading*. Se eligió el agua como medio para hacer los estudios de liberación ya que el fármaco es hidrosoluble y el polímero no.

En la Tabla 3 se muestran los disolventes utilizados y su capacidad de disolución de ambas sustancias.

Tabla 3 Diferentes disolventes estudiados y si disuelven o no el EuRS100 y la bupivacaína.

Disolventes/Polímeros	EuRS100	Bupivacaína
Etanol	Sí	Sí
Agua	No	Sí
Acetato de etilo	Sí	Baja
Acetona	Sí	Sí
Acetonitrilo	Sí	Sí
DMSO	Sí	Sí

Para precipitar el polímero tras su disolución, se seleccionó el HCl. Esta elección se debió a que, como muestra la Figura 18, tras eliminar el polímero de la disolución con el procedimiento mencionado, se observó una gran disminución de la absorbancia de la muestra en el UV-Vis en comparación con la misma muestra sin haber aplicado el protocolo. Es decir, gracias al protocolo se eliminaba polímero.

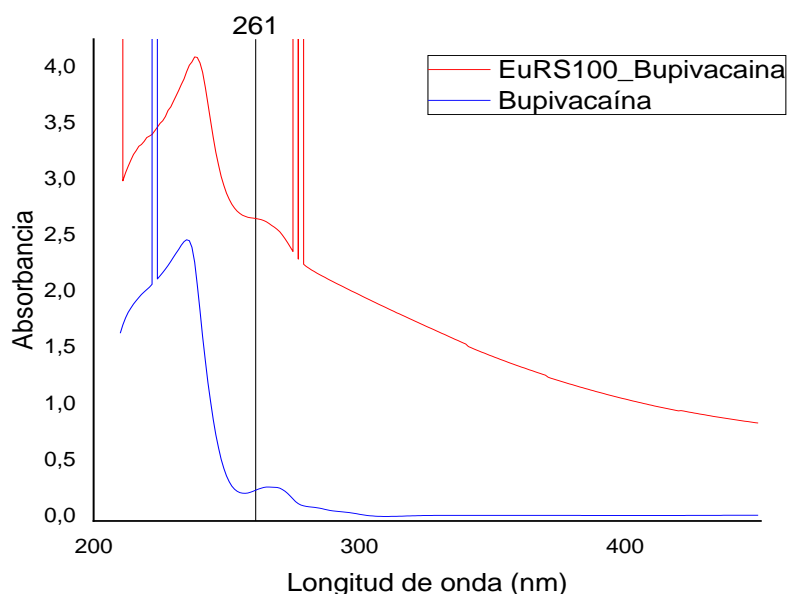


Figura 18 Efecto de echar HCl 0,1 M a la disolución de los apósitos con fármaco, centrifugar y filtrar en la absorbancia medida con el espectrofotómetro UV-Vis. Se marca la longitud de onda a 261 nm donde se encuentra el máximo donde se mediría la concentración del fármaco.

Se comprobó que las indicaciones del proveedor Sigma Aldrich®¹⁹, de la cantidad de bupivacaína que se puede disolver en agua eran correctas, constatándose que se disolvían hasta 50 mg de bupivacaína por cada 1 mL.

4.2 Mezcla física, filamentos y apósitos creados



Figura 19 Mezclas físicas a partir de las cuales se elaboraron los filamentos. Izquierda: EuRS100-Bupivacaina, centro: EuRS100 y derecha: PCL-bupivacaina.

En la Figura 19 se pueden observar cómo quedaron cada mezcla de polímero y del fármaco tras su síntesis. En la imagen las mezclas acababan de ser sacadas de la estufa. Para comprobar que había fármaco se cogieron dos muestras y se le aplicó el procedimiento para disolverlo, retirar el polímero e identificarlo mediante espectrofotometría UV-Vis.

La Figura 20 muestra la caracterización realizada mediante el UV-Vis de dos trozos de mezcla física de EuRS100-bupivacaína en una disolución de etanol y HCl 0,1 M. Se comprueba que aparecen dos bandas de absorción a longitudes de onda de 261 y 271 nm, las cuales son características de la bupivacaína¹⁹, lo que indica su presencia en la mezcla.

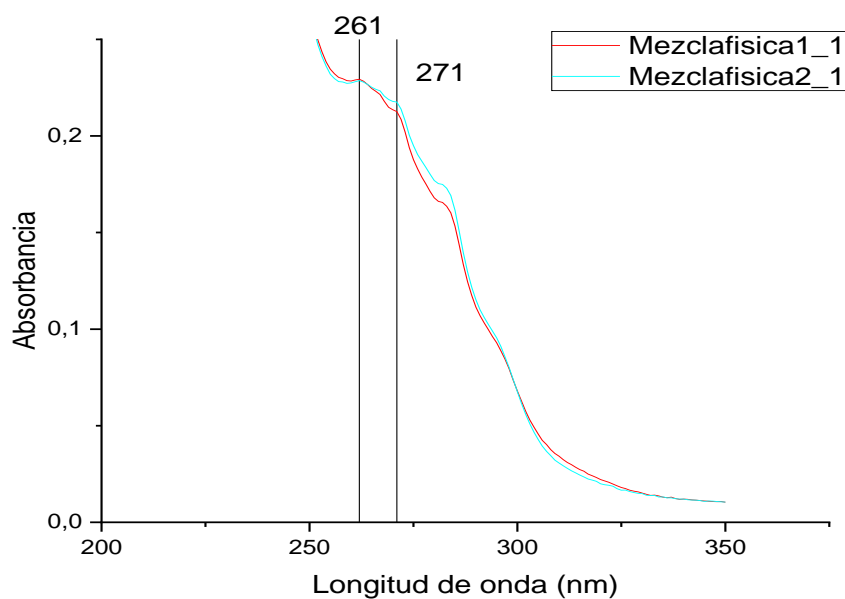


Figura 20 Espectrograma de dos mezclas físicas diferentes de EuRS100-Bupivacaína, medidas con el UV-Vis, en una disolución de etanol y HCl.

La Figura 21 muestra los tres tipos de filamentos que habían sido elaborados con la extrusora. Todos ellos superaron la prueba del *pasa no pasa* (diámetro igual a 1,75 mm). Los de EuRS100-bupivacaína como los de EuRS100, eran rígidos mientras que los de PCL-bupivacaína eran flexibles. Entre los dos tipos de filamentos que contienen EuRS100, aquellos que contenían el fármaco eran algo más flexibles. Este hecho se debe a que la bupivacaína actúa como plastificante y disminuye la temperatura de fusión de 150 °C a 130 °C.

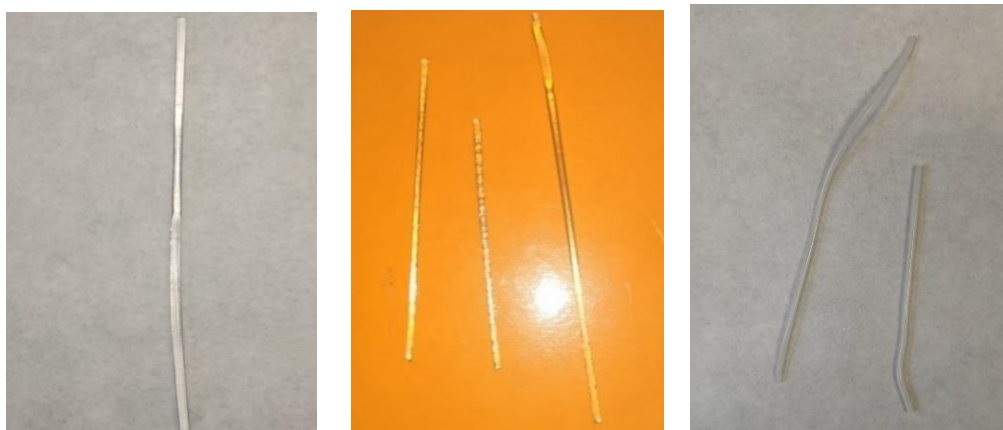


Figura 21 Filamentos creados mediante el proceso de extrusión en caliente. Izquierda: EuRS100-Bupivacaína, centro: EuRS100 y derecha: PCL-bupivacaína.

La Figura 22 muestra la caracterización mediante UV-Vis de tres trozos filamentos de EuRS100-bupivacaína, en una disolución de etanol y HCl 0,1 M, para comprobar la presencia de dicho fármaco en ellos.

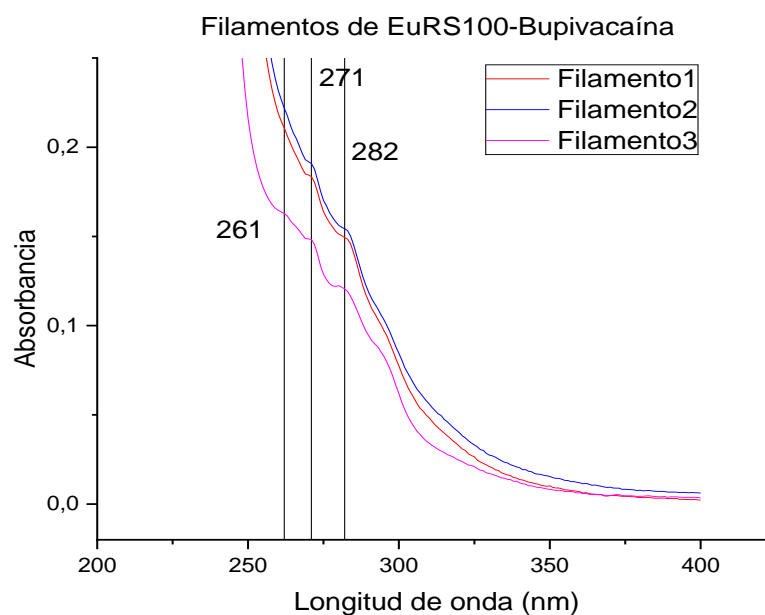


Figura 22 Espectrofotograma de tres filamentos diferentes de EuRS100-bupivacaína, medidos con el UV-Vis, en una disolución de etanol y HCl 0,1 M.

Como se puede comprobar, se ven los máximos característicos del fármaco a 261 nm y 271 nm. También aparece un máximo a 282 nm el cual no se debe a la bupivacaína ya que también aparece en muestras que solo contenían el polímero EuRS100, ver Figura 25.

La Figura 23 muestra los apósitos elaborados con la impresora 3D. Su tamaño era de 12 x 17,5 x 0,75 mm. Los apósitos de la mezcla PCL-bupivacaína eran relativamente flexibles mientras que los otros dos tipos no. Aunque el peso de cada apósito depende de cada material y puede variar en cada impresión, el de estos era de 40 mg +/- 5 mg.



Figura 23 Apósitos elaborados con la impresora 3D. Izquierda: EuRS100-Bupivacaína, centro: EuRS100 y derecha PCL-Bupivacaína

La Figura 24 muestra los espectros obtenidos mediante FTIR de una muestra de bupivacaína, otra de EuRS100 (grajeas) y otra de EuRS100-bupivacaína (apósito), realizados para comprobar la presencia de fármaco en ellos.

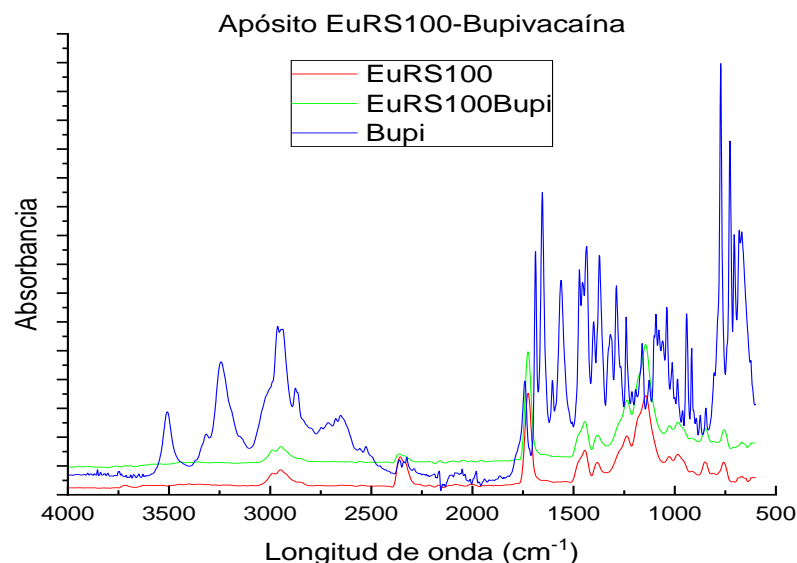


Figura 24 Espectrofotograma obtenido del análisis mediante FTIR de una muestra de bupivacaína (azul), una muestra de EuRS100-bupivacaína y otra de EuRS100.

En el rango del espectro electromagnético, entre 500 y 4000 cm^{-1} de longitud de onda, no se pudo verificar la presencia de bupivacaína en los apósito. Sus máximos característicos a 1610 cm^{-1} (debido al grupo N-H)³⁵ y a 1750 cm^{-1} (debido al grupo C=O)³⁵, no aparecen en el espectro correspondiente al EuRS100-bupivacaína (curva verde). La razón podría ser que las cantidades del fármaco usadas en este estudio eran muy pequeñas en comparación con la cantidad de polímero. Por ello se repitió la caracterización, pero mediante UV-Vis. Para ver todas las caracterizaciones que se hicieron mediante el FTIR, ir al apartado Anexo 3: Análisis FTIR

La Figura 25 muestra la caracterización de un apósito de EuRS100-bupivacaína y otro de EuRS100 en una disolución de etanol y HCl 0,1 M (molar). Se pueden comparar con el espectro de una muestra de bupivacaína a 200 ppm (partes por millón).

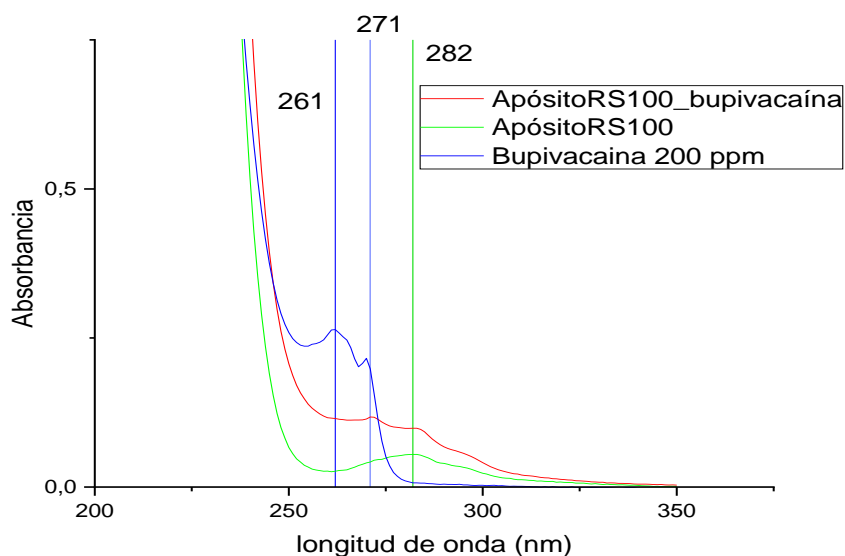


Figura 25 Espectrofotograma de 2 apósitos uno de EuRS100-Bupivacaína y otro de EuRS100-solo, medidos con el UV-Vis, en una disolución de etanol y HCl 0,1 M. También se muestra el espectro de una disolución de bupivacaína a 200 ppm.

Analizando los espectros obtenidos por UV-Vis de la absorbancia del EuRS100-bupivacaína se comprueba que aparece el máximo a 271 nm de longitud de onda correspondiente a la bupivacaína. Se comprueba con la curva correspondiente a la bupivacaína libre. Debido a la presencia de EuRS100 en la medida de este apósito, el máximo del fármaco en la curva de absorbancia a 261 nm queda oculto. En el espectrofotograma de la muestra de EuRS100 (curva verde) se observa que hay un máximo a 282 nm, correspondiente al polímero; no aparecen los máximos de la bupivacaína que si aparecían en las otras dos curvas.

Apartir de la valoración de ambos espectrofotogramas, se cree que, si el protocolo para eliminar el polímero hubiese funcionado de manera ideal, se habría eliminado todo rastro de polímero y por tanto se habría obtenido una curva de valor cero. En consecuencia el *drug loading* no pudo calculado de forma exacta por este procedimiento ya que queda algo de polímero que no ha podido ser eliminado junto con el fármaco. Una potencial solución sería analizarlo mediante cromatografía HPLC para separar el polímero del fármaco. No obstante, se llevará a cabo de esta manera en el futuro.

4.3 Caracterización de los apósitos

4.3.1 Durabilidad de la bupivacaína: TGA y degradación en agua (UV-Vis)

Como resultados de la TGA se obtuvieron las temperaturas de degradación de los diferentes materiales que se usaron para elaborar los diferentes apósitos (Tabla 4):

Tabla 4 Temperaturas de degradación de los diferentes componentes usados para la elaboración de los apósitos.

Atmósfera	Temperatura degradación bupivacaína (°C)	Temperatura degradación PCL (°C)	Temperatura degradación EuRS100 (°C)
Aire	256,96	382,55	350,69

Las temperaturas de degradación eran muy superiores a las temperaturas de extrusión e impresión, las cuales no superaban los 160 °C, por cual no se degradarían los materiales en su proceso de fusión. Para ver todos los resultados de las TGA, ir al Anexo 2: Análisis TGA.

Las distintas medidas realizadas en el UV-Vis para comprobar si la bupivacaína mezclada con agua se degradaba mientras permanecía en el frigorífico durante dos semanas (condiciones reales de conservación del fármaco), dieron resultados muy similares entre sí y no mostraron ninguna evidencia de degradación. Como consecuencia, se deduce que la bupivacaína era estable, bajo esas condiciones.

4.3.2 Absorción de agua.

En la Figura 26 se observa que los apósitos fabricados a partir del material EuRS100-bupivacaína absorben mucha más cantidad de agua que sus homólogos del PCL-bupivacaína. Esto se debe a su capacidad de hincharse. Entre los dos tipos de apósitos, los que llevaban hidrocloreto de bupivacaína, absorben con más rapidez el agua, posiblemente debido al carácter hidrofílico de la bupivacaína. Los resultados se expresan como porcentaje del peso en seco del apósito, como se mencionaba en la sección 3.2.4 Absorción de agua.

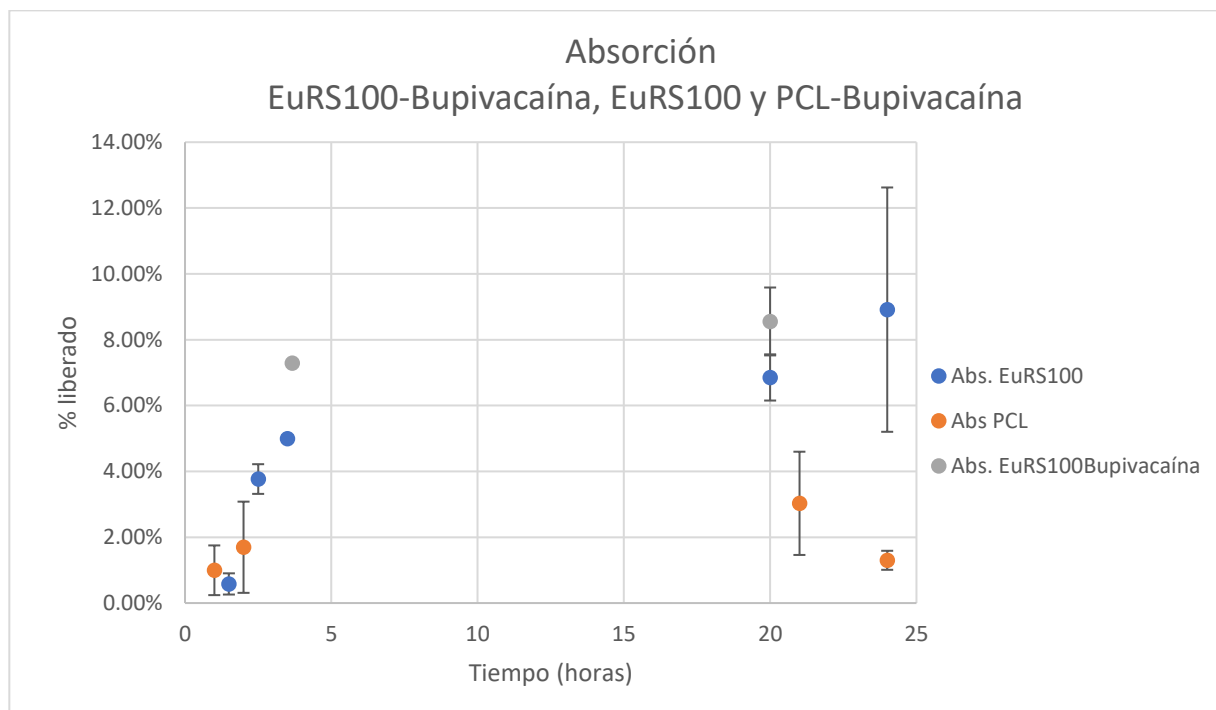


Figura 26 Absorción de agua tras 24 horas de inmersión de los apósitos. Los círculos en azul se refieren a los apósitos de EuRS100 sin bupivacaína, los círculos naranjas a los apósitos de PCL con bupivacaína y los grises hacen referencia a los apósitos de EuRS100 con bupivacaína.

4.3.3 Impregnación de apósitos de EuRS100

Para calcular de manera aproximada la cantidad de bupivacaína adsorbida por apósito se pesaron los apósitos antes de sumergirlos y después, habiendo secado los apósitos con papel absorbente (Tabla 5).

Tabla 5 Valores usados en el cálculo de la cantidad de bupivacaína adsorbida en cada uno de los diferentes apósitos por el método de impregnación.

	Diferencia en la concentración de sobrenadantes ppm	Peso ganado por apósito mg	Bupivacaína en apósito mg
Apósito 1	2383,02	3,36	0,129
Apósito 2	1892,69	3,00	0,115
Apósito 3	835,57	1,80	0,069

El cálculo de la cantidad de bupivacaína por apósito se realiza a partir de: el peso ganado por cada apósito tras el proceso de impregnación, la diferencia entre las concentraciones de los sobrenadantes (antes y después del mismo), la densidad de los sobrenadantes es 1040 mg/mL. La fórmula utilizada para calcular los valores de la columna “bupivacaína en apósito” fue:

$$\text{Bupivacaína (mg)} = (\text{Peso inicial} - \text{Peso después de impregnar}) * \frac{1 \text{ mL disolución}}{1040 \text{ mg disolución}} * \frac{40 \text{ mg bupivacaína}}{1 \text{ mL disolución}}$$

Según el método objeto de estudio, un apósito con un peso de 40 mg, preparado a partir de una proporción de 50 mg de bupivacaína por cada 5050 mg de mezcla física, contendría unos 0,396 mg de fármaco. Comparado con los resultados del método convencional recogidos en la última columna de la Tabla 5, se confirma que el apósito diseñado con el método novedoso es capaz de cargar más fármaco.

4.3.4 Rectas de calibrado

4.3.4.1 Recta de calibrado para calcular el *drug loading*

La concentración teórica de fármaco en los apósitos, teniendo en cuenta que se echaban 1 mL de etanol por cada 10 mg de EuRS100, y hay 50 mg de bupivacaína por cada 5 g de EuRS100, era de 99,09 ppm. Aunque la primera recta que se hizo, de etanol y HCl con concentraciones conocidas de fármaco, (Figura 27), ajustaba muy bien ($R^2=0.999$), no servía para calcular el *drug loading*. El problema era que, al interpolar el valor de absorbancia en la ecuación de la recta de calibrado, valor obtenido en el UV-Vis al medir un apósito de EuRS100-bupivacaína, todos los resultados daban una concentración de entre 150-250 ppm. Lo cual no es factible porque la concentración, aunque pueda no ser homogénea a lo largo del apósito, no puede ser en todas las medidas mayor a la teórica.

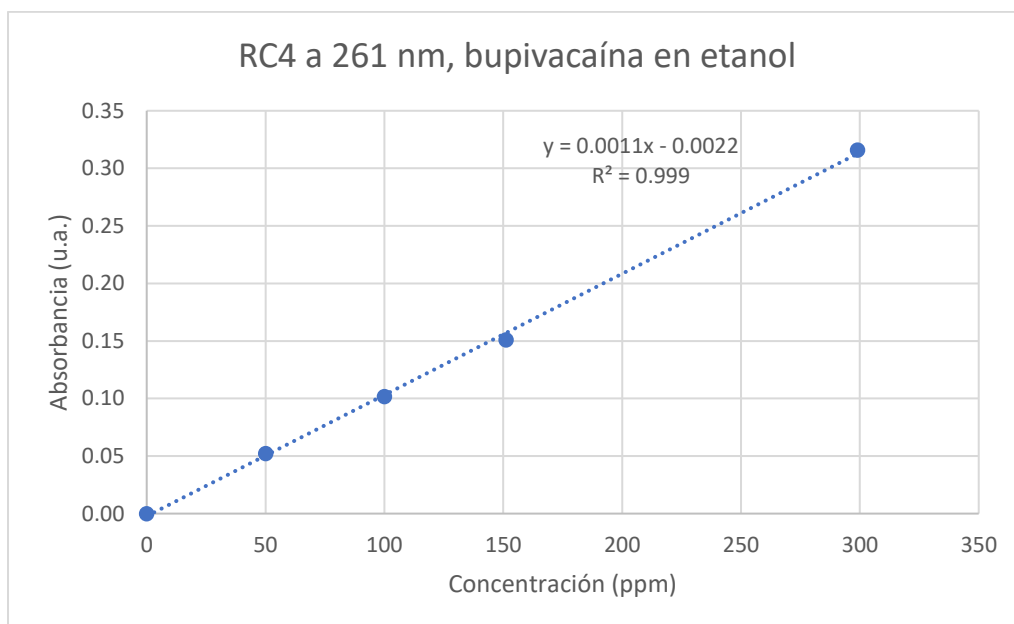


Figura 27 Recta de calibrado, calculada a partir de apósitos de EuRS100 disueltos en una disolución de etanol con bupivacaína a diferentes concentraciones conocidas. Las medidas se tomaron en el UV-Vis Jasco a 261 nm es la longitud de onda a la que se apreciaba absorbancia de la bupivacaína.

El problema se analizó a través de varias pruebas. En primer lugar, se hicieron las de degradación de fármaco tanto por la temperatura a la que se le sometía, como por el tiempo transcurrido entre la impresión del apósito y su medición en el UV-Vis. Tras comparar los espectrogramas de la mezcla física, los filamentos y los apósitos de EuRS100-bupivacaína (la Figura 20, la Figura 22 y la Figura 25), se comprobó que todos los resultados daban espectros muy similares en cuanto a forma, pero que el valor del máximo de la curva, a 261 nm, variaba. Esto podía significar dos cosas: o bien que no había una carga homogénea de fármaco en la mezcla, o que el protocolo de purificación no eliminaba todo el polímero.

Para comprobar la segunda causa, se hizo una recta de calibrado utilizando como línea base un apósito de EuRS100 sin fármaco disuelto en etanol. Se seguía observando lo mismo, las medidas daban una concentración de bupivacaína en los apósitos más alta que la teórica. Se llegó a la conclusión de que el protocolo descrito (apartado 2.2.8) no era capaz de

precipitar y eliminar todo el polímero, aunque, como mostraba la Figura 18, pareciese que sí. Una explicación para esto puede ser que tal protocolo no era robusto, es decir, en unos casos eliminaba más polímero que en otros. De ahí que diferentes medidas no dieran el mismo resultado, y se obtuvieran concentraciones más altas que la teórica. Los espectros obtenidos del UV-Vis de la Figura 25 corroboraban estos datos.

Se probaron otros dos disolventes para eliminar todo el polímero antes de realizar la medición en el UV-Vis, el DMSO y la acetona, para añadir agua posteriormente y precipitar el polímero. Las pruebas con el DMSO dieron como resultado una concentración alta de bupivacaína, como en los casos anteriores. Además, los valores de concentración eran muy variables y por lo tanto no reproducibles.

En la primera prueba que se hizo con la acetona, se disolvieron apósitos de EuRS100 sin fármaco en 0.1 mL y se añadió 1 mL de agua. Como el polímero es insoluble en agua precipitó, así que se procedió a centrifugarlo y filtrarlo. En el segundo caso, la misma mezcla se calentó durante 1 hora a 62 °C para evaporar la acetona, facilitar la precipitación de todo el polímero y su posterior eliminación. En ambos casos el UV-Vis detectaba una concentración de bupivacaína superior a 99,09 ppm.

4.3.4.2 Recta de calibrado (RC) de agua.

Esta recta es la que se usa para medir los sobrenadantes de las diferentes muestras de liberación, en las que solo habrá bupivacaína y agua, ya que el EuRS100 es insoluble. Las concentraciones seleccionadas fueron: 300, 200, 100, 40, 20 y 10 ppm.

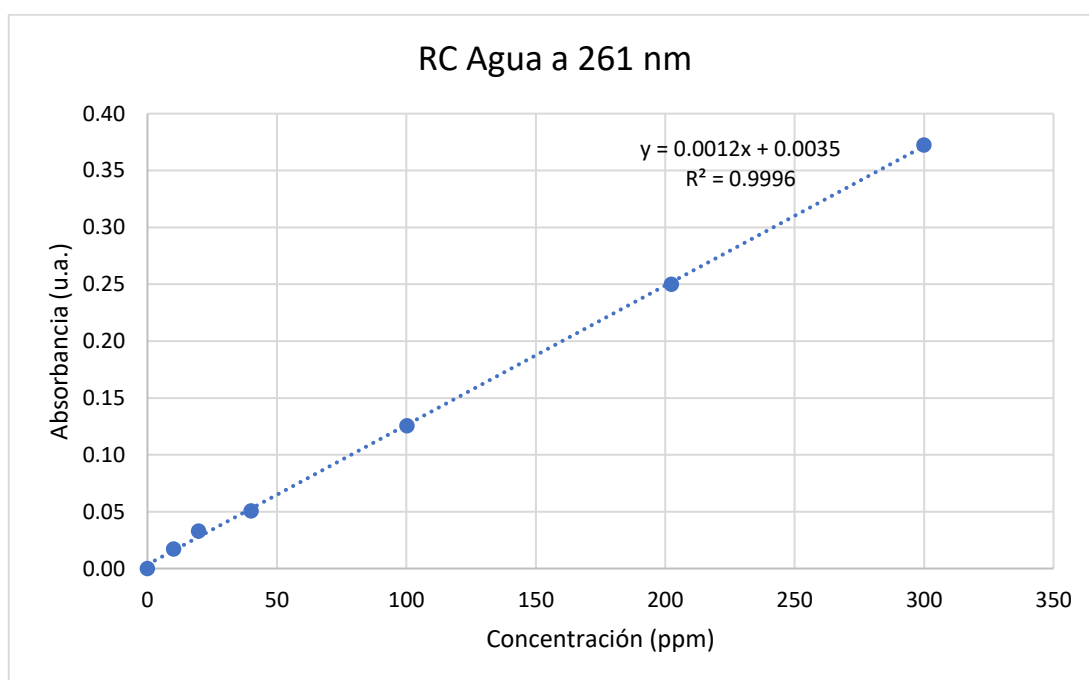


Figura 28 RC de bupivacaína disuelta en agua. Las medidas se tomaron en el UV-Vis Jasco a 261 nm que es la longitud de onda a la que se apreciaba un máximo de absorción.

Para certificar que la recta era funcional, se prepararon tres disoluciones a 5 ppm, 10 ppm y 50 ppm y se comprobó que los valores que se obtenían usando la recta de calibrado eran prácticamente los mismo que los reales. Sin embargo, posteriormente se comprobó que, si esta recta se dividía en dos, una para bajas concentraciones y otra para altas los resultados que se obtenían eran incluso mejores (ver Figura 29 y Figura 30).

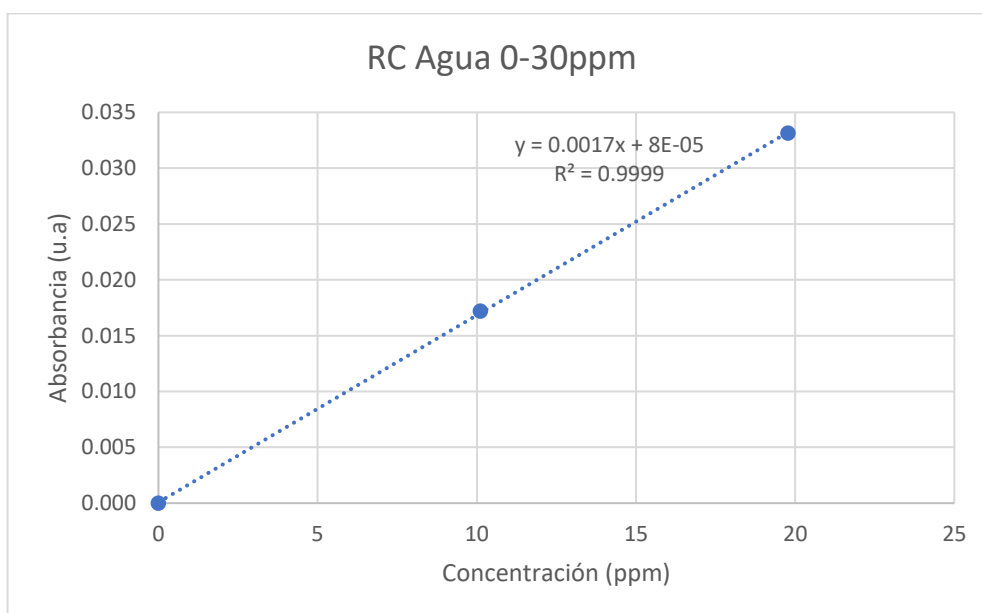


Figura 29 RC de disoluciones de bupivacaína en agua a concentraciones entre 0 y 30 ppm. Medidas obtenidas mediante el UV-Vis.

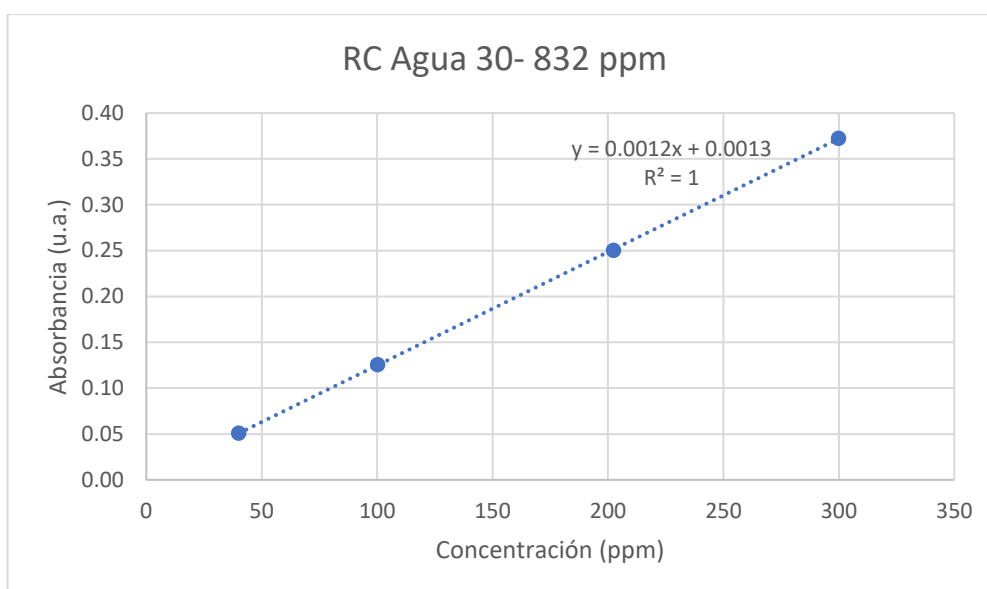


Figura 30 RC de disoluciones de bupivacaína en agua a concentraciones entre 30 y 832 ppm, Medidas obtenidas mediante el UV-Vis.

En esta segunda figura, se ve que el valor máximo que con esta recta se puede detectar era una concentración de 832 ppm. Por encima de esta concentración la relación *valor de absorbancia–valor de concentración* dejaría de ser lineal, y por tanto, los valores obtenidos no serían correctos.

4.3.5 Liberación de fármaco

Todas las liberaciones se han normalizado en función del máximo de liberación obtenido de hacer este estudio a tres apósitos de EuRS100-bupivacaína durante siete días. El valor tomado como máximo es la media de los valores obtenidos de los tres apósitos.

En la Figura 31 se muestran los resultados de la liberación de los apósitos de EuRS100 con bupivacaína. La liberación era progresiva, aumentando la concentración conforme pasaba el tiempo hasta que a las 20 horas se estabiliza, indicando que el tiempo de liberación útil finaliza.

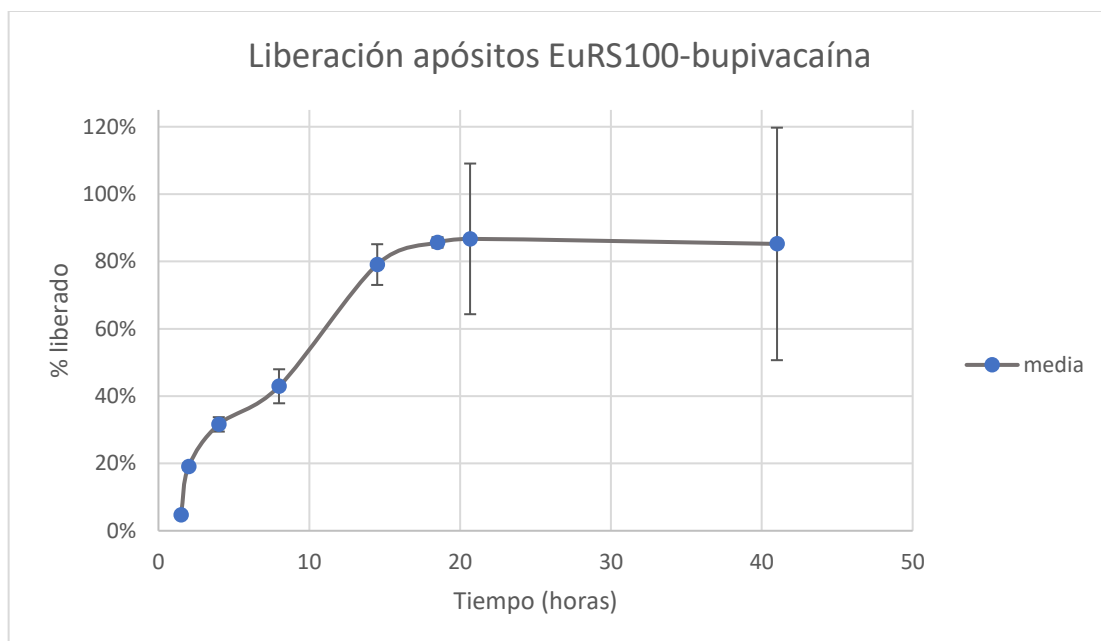


Figura 31 Liberación de fármaco, a 37°C, de los diferentes apósitos de EuRS100 con bupivacaína.

La Figura 32, muestra la liberación de fármaco observada en los apósitos de PCL- bupivacaína. También se observa un perfil de liberación similar al del EuRS100, sin embargo, libera una menor cantidad de fármaco. En las primeras horas, la liberación en ambos apósitos es muy similar. Esto puede deberse a que se está liberando la bupivacaína situada en la superficie de los apósitos impresos. Conforme pasa el tiempo, se aprecia la capacidad de hincharse y liberar mayor cantidad de fármaco del polímero EuRS100, y por tanto, continúa liberando. A las 20 horas se observa una diferencia en la liberación de ambos apósitos: 65% del PCL frente al 86% del EuRS100.

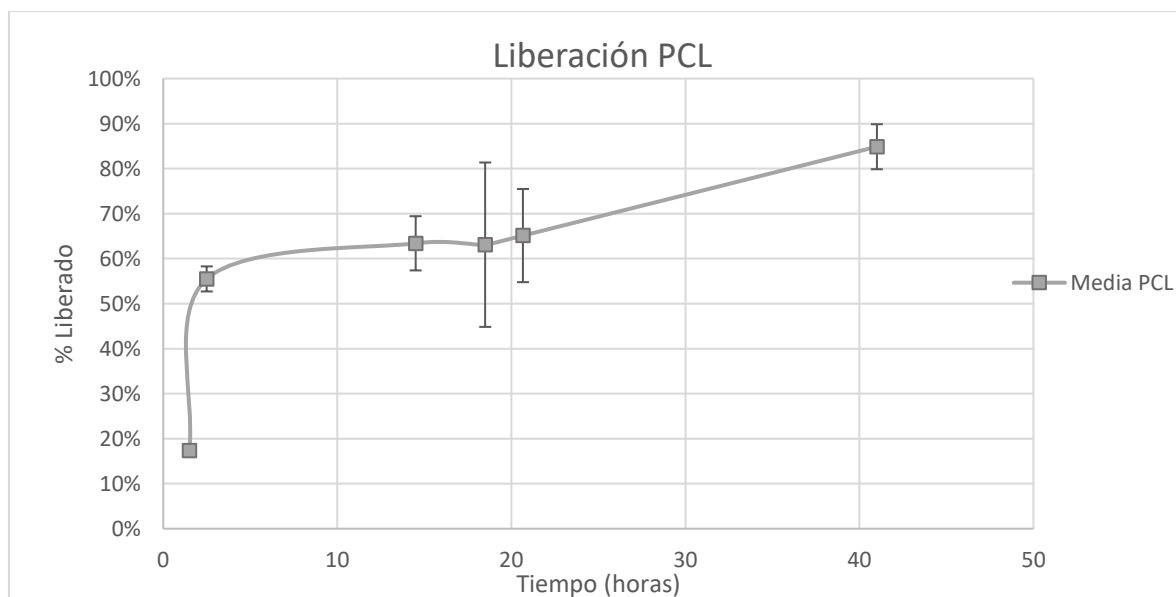


Figura 32 Liberación de fármaco, a 37°C, de los diferentes apósitos de PCL con bupivacaína.

La Figura 33 muestra el estudio de liberación de los apósitos impregnados en una solución casi saturada de bupivacaína en agua. No se aprecia perfil de liberación. De hecho, en la primera medida, tomada a los 90 minutos, ya se había alcanzado el máximo de liberación. La obtención de diferentes valores en las medidas correspondientes a otros tiempos, quiere decir, que la impregnación no fue homogénea en todo el apósito muestra. Pero queda claro que la bupivacaína, con este método, se queda en la superficie y por tanto se libera de forma abrupta.

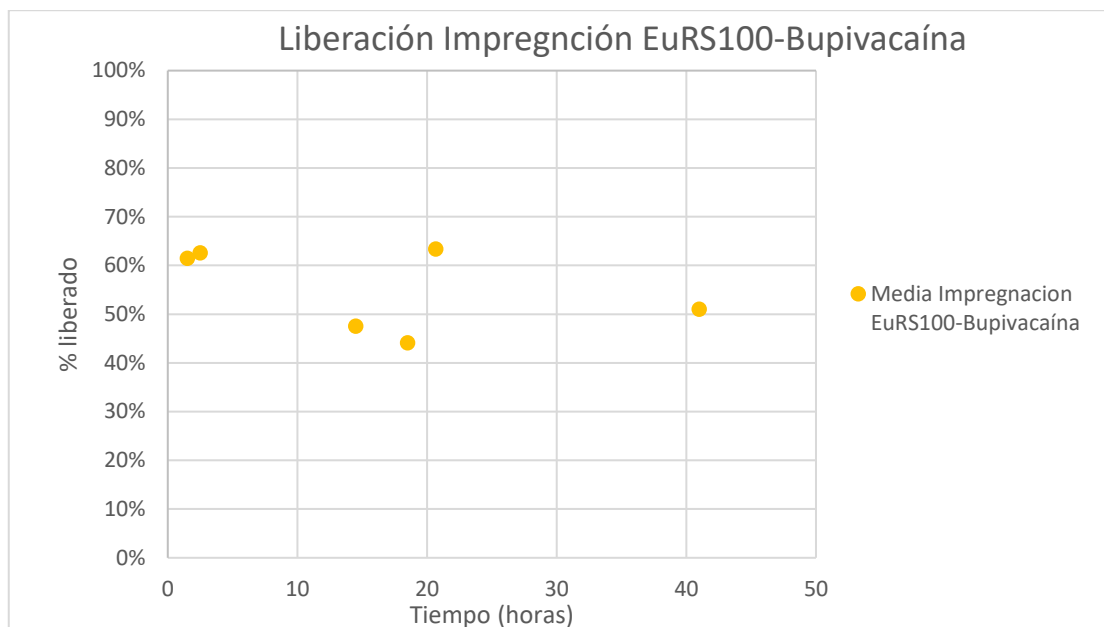


Figura 33 Liberación de fármaco, a 37°C, de los diferentes apósitos de EuRS100 impregnados con bupivacaína.

Como resumen de este apartado se muestran en la Tabla 6 los resultados del estudio de liberación de cada variante de apósito.

Tabla 6 Valores de liberación (%) de las tres variantes de apósito estudiadas. Todas las medidas están normalizadas según el valor de liberación tras 7 días de apósitos de EuRS100-bupivacaína

Tiempo (h)	EuRS100 Impregnado con bupivacaína	PCL-bupivacaína	EuRS100-bupivacaína
1,5	61,5%	17,4%	4,7%
2,5	62,6%	55,5%	19,0%
14,5	47,5%	63,4%	79,1%
18,5	44,2%	63,1%	85,6%
20,7	63,4%	65,1%	86,7%

Se puede comprobar como el EuRS100 tienen un mejor perfil de liberación ya que a las 2,5 horas solo ha liberado un 20% del fármaco frente al 55,5% liberado por el PCL. A las 18,5 horas mientras que el PCL solo ha liberado un 8% más el EuRS100 ha liberado un 85% del fármaco de su estructura permitiendo una acción más eficiente del fármaco. En el caso de los apósitos impregnados, la cantidad de fármaco liberado no sigue una proyección ascendente. Se debe a que no presente un perfil de liberación, si no que libera todo el fármaco rápidamente ya que solo está en su superficie.

5. Conclusión

A la luz de los resultados obtenidos, se puede afirmar que los apósitos impresos con 3D y elaborados a partir de una mezcla física de EuRS100-bupivacaína son más aptos para la finalidad médica que se pretende. La razón es que se ha probado que la cantidad presente de fármaco por cada miligramo de apósito es mayor en los apósitos elaborados con el método propuesto en el trabajo que en los de fabricación convencional. Así mismo, la liberación de la bupivacaína se produce de manera sostenida en el tiempo, lo que no ocurre en los otros apósitos objeto de la comparación.

La justificación de ambas diferencias es que al fabricar los filamentos a partir de una mezcla de polímero-fármaco, se les puede cargar con una cantidad de principio activo que es independiente de la superficie de contacto del apósito, lo que no es posible en los apósitos diseñados con impregnación del fármaco, al menos en las condiciones bajo las que se ha hecho el estudio. Además, se ha constatado que la liberación progresiva de esa medicación depende de propiedades del apósito como el biomaterial-base utilizado en su fabricación. En el estudio queda demostrado que el EuRS100 facilita la liberación del fármaco en las primeras veinticuatro horas. Por lo tanto, su función duraría, ese tiempo, más el propio de la acción del fármaco en sí.

Considerando todo lo expuesto, queda probada la mejor eficiencia médica/clínica de los apósitos fabricados a partir de una mezcla física de polímero termoplástico (EuRS100), y fármaco, por impresión 3D, puesto que no sólo permite que se creen apósitos de tamaños y formas variables, con más cantidad de principio activo, sino que también facilita la liberación sostenida en el tiempo

Otra ventaja que tienen estos apósitos es que permiten un uso más adecuado y rentable del fármaco, ya que para el mismo efecto médico se necesitará menos cantidad. Más aun teniendo en cuenta que, dado que su capacidad de absorción es cuatro veces mayor que la de los elaborados con PCL, evitan mejor la acumulación de exudados. Esto hará más factible su uso en heridas abiertas. Como consecuencia de todo ello disminuye tanto el riesgo de efectos secundarios, como la cantidad de deshechos que se generan.

No obstante, en el estudio realizado han quedado algunos aspectos pendientes como son:

- El *drug loading* de cada apósito de EuRS100-bupivacaína no se pudo calcular ya que no se consiguió eliminar el polímero completamente de la muestra disuelta. Para poder medirlo, habría que usar la técnica de cromatografía líquida.
- Los apósitos de EuRS100 son demasiado frágiles, lo cual es una desventaja importante. Para su viabilidad real, sería necesario estudiar cómo el uso de plastificantes, que pueden mejorar la flexibilidad y facilitar el procesamiento de los polímeros, afecta tanto a las propiedades mecánicas de los apósitos como al perfil de liberación. Durante las prácticas¹ se probó a mezclar el EuRS100 con plastificantes como el trietilcitrate (TEC), el polietilenglicol 400 (PEG400) o el ácido cítrico (AC). De los tres se descartó el AC por necesitar mayor cantidad de plastificante para conseguir resultados similares a los obtenidos con TEC y PEG. Se hicieron apósitos con EuRS100-bupivacaína-TEC (7,5 wt.%) y otros con EuRS100-bupivacaína-PEG400 (7,5 wt.%). En ambos se observó que los apósitos eran más flexibles. En el caso del PEG400 en estudios como el de S. Amandeep et al.³⁶ se concluyó que el uso de este plastificante favorecía al perfil de liberación del fármaco. Sin embargo, en este estudio no se caracterizaron estos apósitos debido a la dificultad para poder calcular el *drug loading*, ya que todos estos compuestos orgánicos aparecen en el mismo rango de longitudes de onda al ser analizados con el UV-Vis y se solaparían unos con otros.

- En caso de hacer un estudio in vivo, se recomienda usar la levobupivacaína con carácter lipofílico que en vez de la bupivacaína hidrofílica, para así favorecer la penetración a través del SC de la piel y favorecer la acción anestésica del fármaco. Otras de las razones por las que se hace esta recomendación es porque la levobupivacaína, que es el enantiómero S de la bupivacaína, presenta menor cardiotoxicidad y menos efectos secundarios para el sistema nervioso central³⁷.

En resumen, queda demostrada la mayor eficiencia médico-clínica, funcional, económica y hasta medioambiental, de los apósitos diseñados mediante la técnica de impresión 3D FDM que contienen en su estructura el principio activo, frente a los otros apósitos más convencionales objeto del estudio comparativo.

Bibliografía

1. Tajadura A. Memoria de las Prácticas Máster Ingeniería Biomédica de la Universidad de Zaragoza. 2021;
2. Rajabalaya R, David SR, Khanam J. permeation from Eudragit E 100 based chlorpheniramine. 2010;(January).
3. Azad MA, Olawuni D, Kimbell G, Badruddoza AZM, Hossain MS, Sultana T. Polymers for extrusion-based 3D printing of pharmaceuticals: A holistic materials–process perspective. Vol. 12, *Pharmaceutics*. 2020. 1–34 p.
4. Evonik. Evonik Eudragit® polymers – defining targeted drug release The [Internet]. Available from: <https://healthcare.evonik.com/en/pharmaceuticals/oral-drug-delivery/oral-excipients/eudragit-portfolio/sustained-release>
5. Salgado CL, Sanchez EMS, Zavaglia CAC, Granja PL. Biocompatibility and biodegradation of polycaprolactone-sebacic acid blended gels. *J Biomed Mater Res - Part A*. 2012;100 A(1):243–51.
6. Ita K. Anatomy of the human skin. *Transdermal Drug Deliv*. 2020;9–18.
7. Marques M, Ueda CT, Shah VP, Derdzinski K, Ewing G, Flynn G, et al. Topical and transdermal drug products. *Pharmacopeial Forum*. 2009;35(3):750–64.
8. Ita K. Basic principles of transdermal drug delivery. *Transdermal Drug Deliv*. 2020;19–36.
9. Muzzalupo R, Tavano L. Niosomal drug delivery for transdermal targeting: recent advances. *Res Reports Transdermal Drug Deliv*. 2015;23.
10. Uchechi O, Ogbonna JDN, Attama AA. Nanoparticles for Dermal and Transdermal Drug Delivery. *Appl Nanotechnol Drug Deliv*. 2014;
11. Wolk K, Witte K, Sabat R. Interleukin-28 and interleukin-29: Novel regulators of skin biology. *J Interf Cytokine Res*. 2010;30(8):617–28.
12. Ita K. Transcutaneous drug administration. *Transdermal Drug Deliv*. 2020;1–7.
13. Szunerits S, Boukherroub R. Heat: A highly efficient skin enhancer for transdermal drug delivery. *Front Bioeng Biotechnol*. 2018;6(FEB):1–13.
14. Alkilani AZ, McCrudden MTC, Donnelly RF. Transdermal drug delivery: Innovative pharmaceutical developments based on disruption of the barrier properties of the stratum corneum. *Pharmaceutics*. 2015;7(4):438–70.
15. ANESTESICOS LOCALES [Internet]. 2018 [cited 2021 Mar 5]. p. 5. Available from: <https://www.slideshare.net/karloz3033/anestesicos-locales-87312646>
16. Anaesthetics L. Lidocaine : a Common Local Anaesthetic How does it work and how could it be made ? *Univ Read*. :1–3.
17. Aneskey. Joint and Associated Bursa Injections: Shoulders, Elbows, Hips, and Knees | Anesthesia Key [Internet]. [cited 2021 Mar 5]. Available from: <https://aneskey.com/joint-and-associated-bursa-injections-shoulders-elbows-hips-and-knees/>
18. Farmacología de los Anestésicos Locales: Uso racional en Obstetricia [Internet]. [cited 2021 Jun 21]. Available from: https://www.anestesia.org.ar/search/articulos_completos/2/13/378/c.php
19. Sigma-Aldrich. Bupivacaine hydrochloride monohydrate, Product information sheet | Sigma-Aldrich [Internet]. [cited 2021 May 15]. Available from:

<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/bupivacainehydrochloridemonohydrate342907336054011?lang=es®ion=ES>

20. Allevato MA. Sistemas terapéuticos transdérmicos. 2007;154–66.
21. Zorec B, Prémat V, Miklavčič D, Pavšelj N. Active enhancement methods for intra- and transdermal drug delivery: A review. *Zdr Vestn*. 2013;82(5):339–56.
22. Injection Technology for Vaccines and Medicines: Past Evolution, Future Landscape.
23. He X, Sun J, Zhuang J, Xu H, Liu Y, Wu D. Microneedle System for Transdermal Drug and Vaccine Delivery: Devices, Safety, and Prospects. *Dose-Response*. 2019;17(4):1–18.
24. Wikipedia. Espectroscopia ultravioleta-visible - Wikipedia, la enciclopedia libre [Internet]. [cited 2021 Apr 29]. Available from: https://es.wikipedia.org/wiki/Espectroscopia_ultravioleta-visible
25. Spectrophotometer U, Spectrophotometer U, Spectrophotometer U, Spectrophotometer U. V-600 Series.
26. Nag S, Das D, Tudu B, Roy RB. Multivariate analysis of formalin using UV-Vis spectroscopy. 2021 IEEE 2nd Int Conf Control Meas Instrumentation, C 2021 - Proc. 2021;(Cmi):133–7.
27. Schilling SU, Shah NH, Malick AW, Infeld MH, McGinity JW. Citric acid as a solid-state plasticizer for Eudragit RS PO. *J Pharm Pharmacol*. 2007;59(11):1493–500.
28. Wu C, McGinity JW. Influence of methylparaben as a solid-state plasticizer on the physicochemical properties of Eudragit® RS PO hot-melt extrudates. *Eur J Pharm Biopharm*. 2003;56(1):95–100.
29. Yi HG, Choi YJ, Kang KS, Hong JM, Pati RG, Park MN, et al. A 3D-printed local drug delivery patch for pancreatic cancer growth suppression. *J Control Release*. 2016;238:231–41.
30. Atef M, Rezaei M, Behrooz R. Characterization of physical, mechanical, and antibacterial properties of agar-cellulose bionanocomposite films incorporated with savory essential oil. *Food Hydrocoll* [Internet]. 2015;45:150–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.09.037>
31. Valencia-Gómez LE, Martel-Estrada SA, Vargas-Requena C, Rivera-Armenta JL, Alba-Baena N, Rodríguez-González C, et al. Chitosan/Mimosa tenuiflora films as potential cellular patch for skin regeneration. *Int J Biol Macromol* [Internet]. 2016;93:1217–25. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.09.083>
32. Kiaee G, Etaat M, Kiaee B, Kiaei S, Javar HA. Multilayered Controlled Released Topical Patch Containing Tetracycline for Wound Dressing. *J Silico Vitro Pharmacol*. 2016;02(02).
33. Psimadas D, Georgoulas P, Valotassiou V, Loudos G. Molecular Nanomedicine Towards Cancer : *J Pharm Sci*. 2012;101(7):2271–80.
34. Dorigato A, Rigotti D, Pegoretti A. materials Novel Poly(Caprolactone)/Epoxy Blends by Additive Manufacturing. [cited 2021 Mar 31]; Available from: www.mdpi.com/journal/materials
35. Zhang Z, Zhang X, Li A, Ma C. Development of bupivacaine decorated reduced graphene oxide and its local anesthetic effect—In vivo study. *J Photochem Photobiol B Biol* [Internet]. 2018;180(December 2017):72–6. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2018.01.012>
36. Singh A, Bali A. Formulation and characterization of transdermal patches for controlled delivery of duloxetine hydrochloride. *J Anal Sci Technol* [Internet]. 2016;7(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s40543-016-0105-6>

37. Niederwanger V, Gozzo F, Griesser UJ. Characterization of Four Crystal Polymorphs and a Monohydrate of S-Bupivacaine Hydrochloride (Levobupivacaina Hydrochloride). J Pharm Sci. 2009;98(3):1064–74.

Anexos

Anexo 1: Parámetros de impresión

La versión utilizada del Cura Ultimaker fue la 4.9. Los parámetros de impresión editados en este software fueron:

- Calidad > Altura de capa: 0,21 mm. Con altura de la capa inicial de 0,21 mm.
- Calidad > Ancho de línea: 0,4 mm. Ancho de línea de pared: 0,4 mm.
- Relleno > Densidad de relleno: 10%. Con distancia entre líneas de relleno de 1,1 mm.
- Relleno > Patrón de relleno: Rejilla (líneas a 90°) entre capas.
- Relleno > Porcentaje de superposición de relleno: 2%.
- Soporte > Sin soporte.
- Adherencia > Sin ayuda para adherencia a la placa de impresión.
- Desplazamiento > Habilitada la retracción. Con una distancia de retracción de 4,5 mm.
- Perímetro > Líneas de pared: 2, con un grosor de pared de 1 mm.
- Perímetro > Capas superiores e inferiores: 0 capas.

Anexo 2: Análisis TGA

En esta sección del anexo se muestran los análisis TGA de los diferentes compuestos, tanto individuales como ya mezclados entre sí, y tras su extrusión. Las termogravimetrías se hicieron en el INMA y por cada muestra se realizó una TGA en atmósfera controlada de aire¹. Las Figuras A 1-6 hacen referencia a los elementos simples, es decir TGAs de los elementos sin mezclar, polímeros, fármacos y plastificantes. Los máximos en las curvas presentes en torno a 100 °C se deben a la pérdida de humedad.

Como ya se ha comentado, comprobando las temperaturas de degradación de los elementos, todos son aptos para su impresión sin riesgo de pérdida de material.

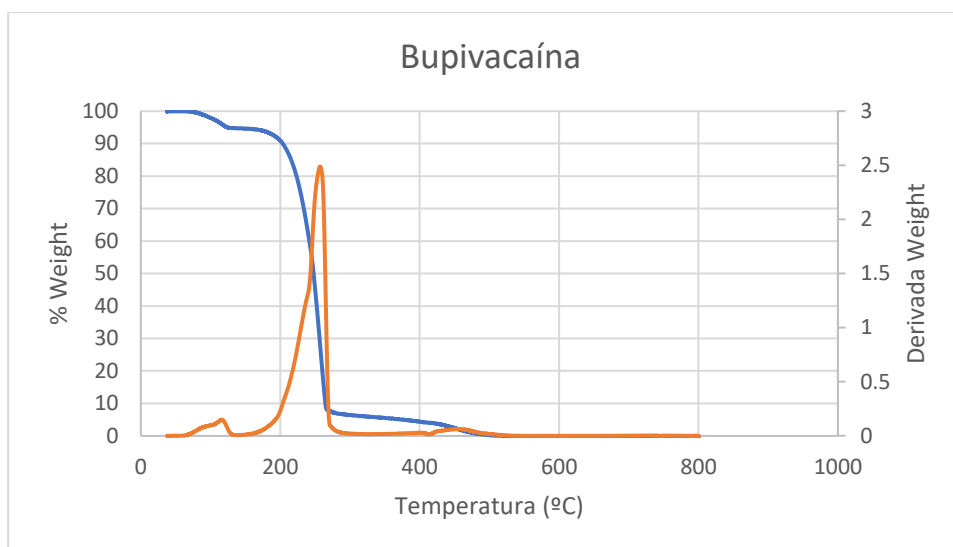


Figura A 1: TGA de la bupivacaína, en atmósfera controlada de aire. Se muestran la curva de la TGA (azul) y la DTG (naranja).

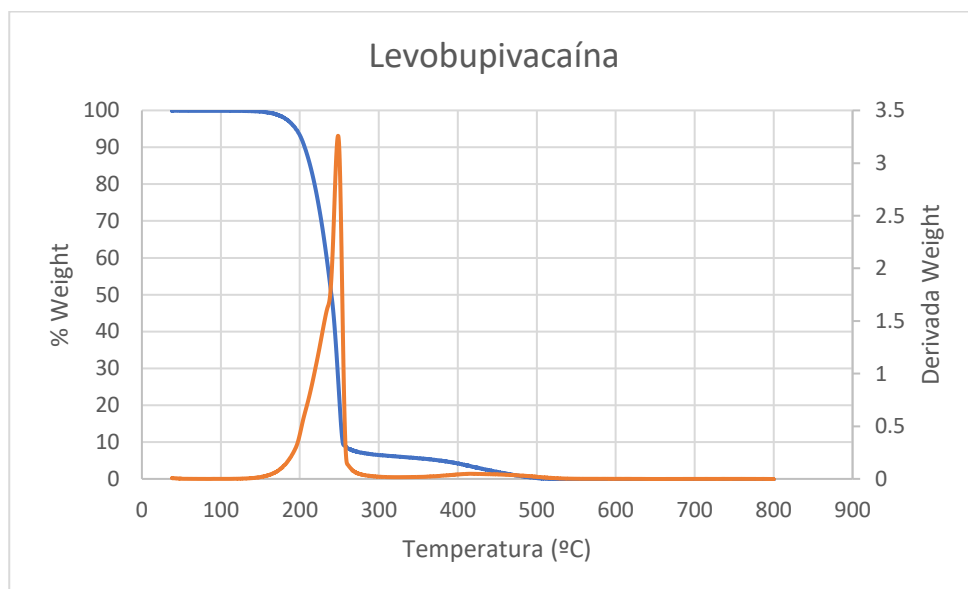


Figura A 2: TGA de la levobupivacaína, en atmósfera controlada de aire. Se muestran la curva de la TGA (azul) y la DTG (naranja).

Entre la Figura A 1 y Figura A 2 apenas se ven diferencias, lo que demuestra que ambos fármacos tienen prácticamente la misma temperatura de degradación y se comportan como si fueran el mismo.

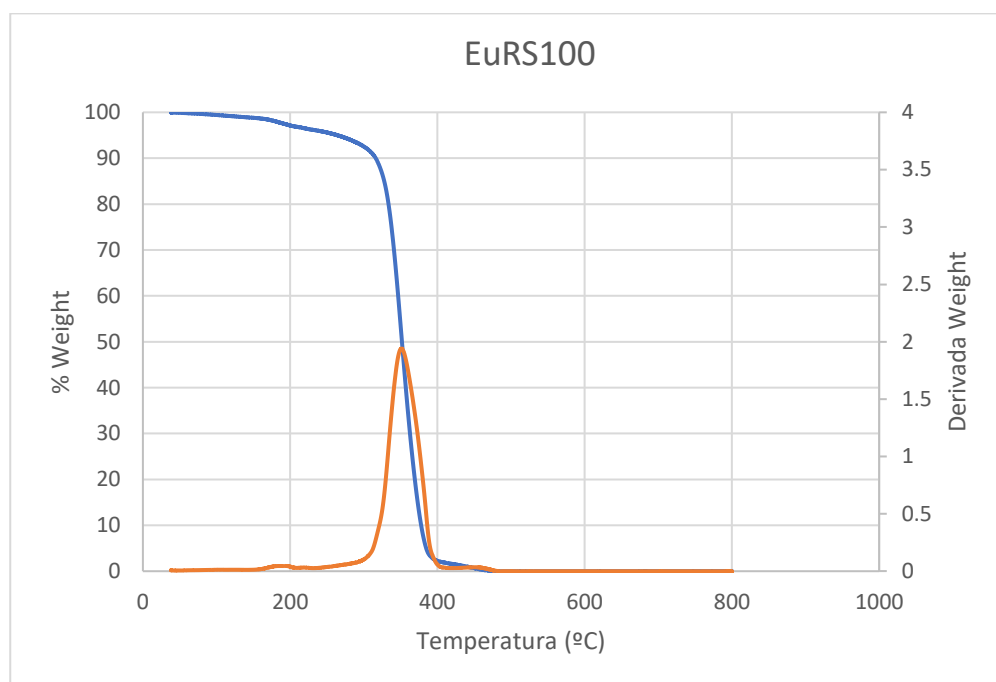


Figura A 3: TGA del EuRS100, en atmósfera controlada de aire. La temperatura se muestra, en el eje de abscisas en °C. Se muestran la curva de la TGA (azul) y la DTG (naranja).

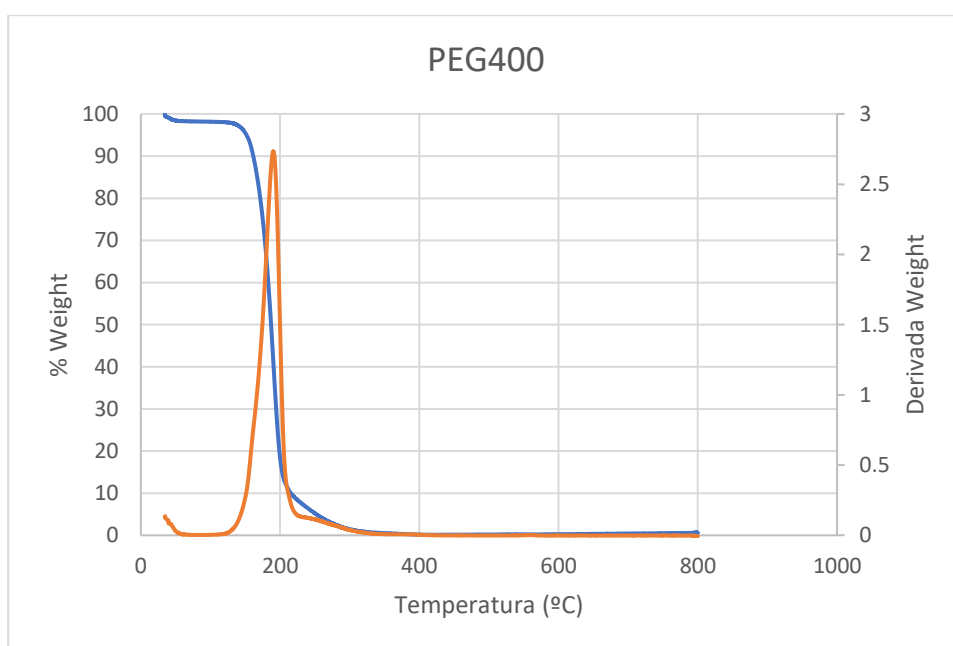


Figura A 4: TGA del PEG 400, en atmósfera controlada de aire. La temperatura se muestra, en el eje de abscisas en °C. Se muestran la curva de la TGA (azul) y la DTG (naranja).

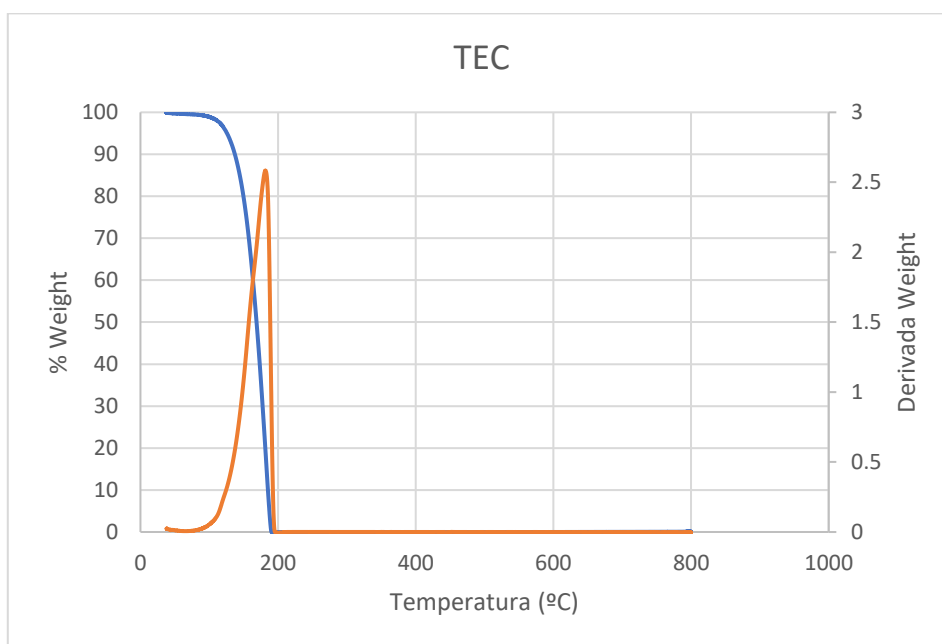


Figura A 5: TGA del trietil citrato, TEC, en atmósfera controlada de aire. La temperatura se muestra, en el eje de abscisas en °C. Se muestran la curva de la TGA (azul) y la DTG (naranja).

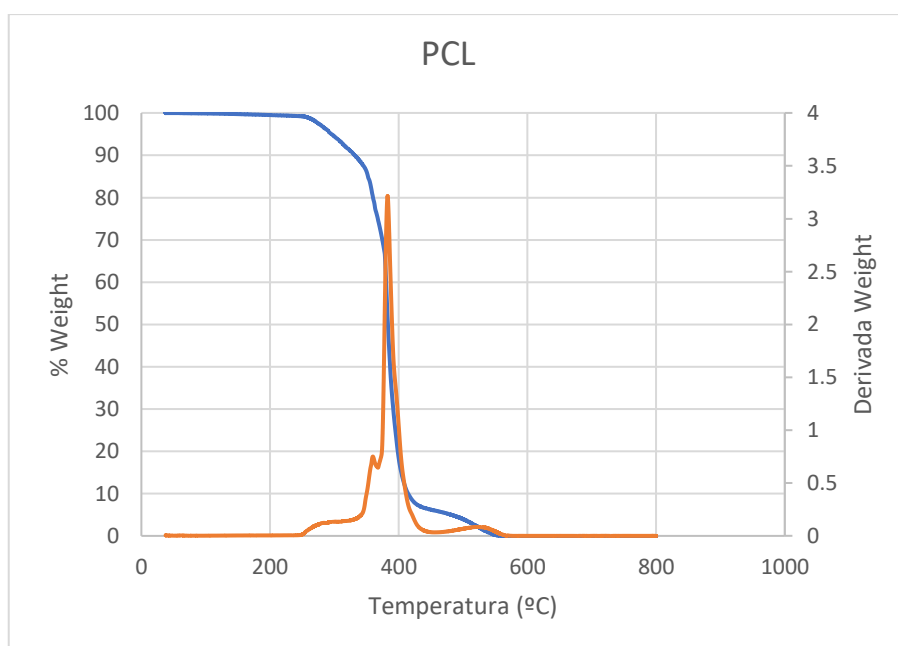


Figura A 6 TGA del polímero PCL, en atmósfera controlada de aire. La temperatura se muestra, en el eje de abscisas en °C. Se muestran la curva de la TGA (azul) y la DTG (naranja).

Las figuras A 7-11 hacen referencia a las mezclas. En todas ellas se pueden observar unos repuntes pequeños en la curva DTG que se dan en torno a 100 °C. Como ya se ha comentado, eso se debe a la pérdida de humedad. También se comprueba que la presencia de plastificantes se nota en la curva TGA en la que se observa un descenso del peso en torno a 190-200 °C, temperatura de degradación de estos, pero no afecta a la temperatura de degradación del conjunto.

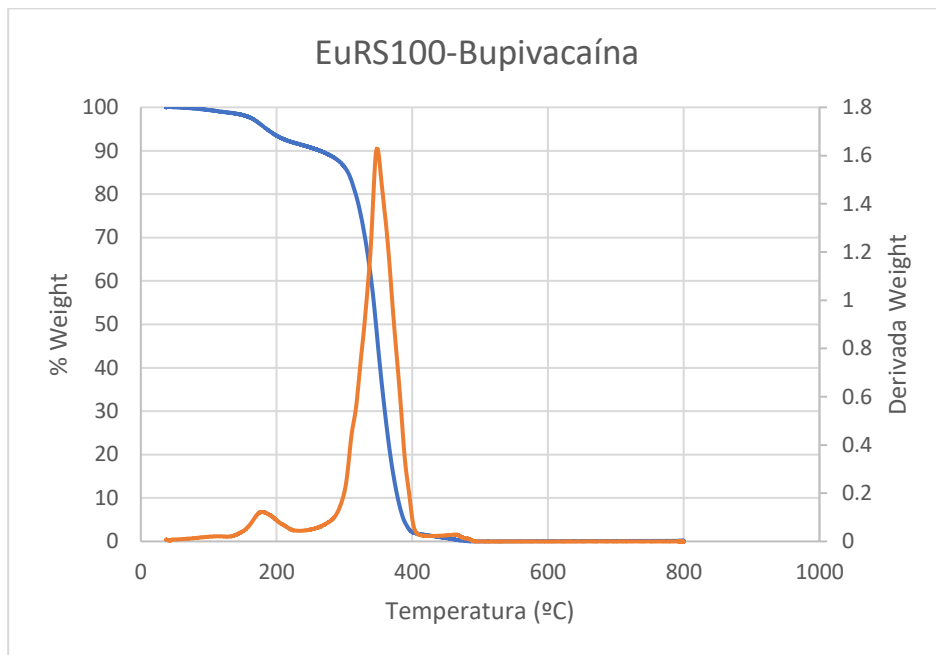


Figura A 7: TGA del filamento de EuRS100-bupivacaína, en atmósfera aire. La temperatura se da en °C. Se muestran la curva de la TGA (azul) y la DTG (naranja).

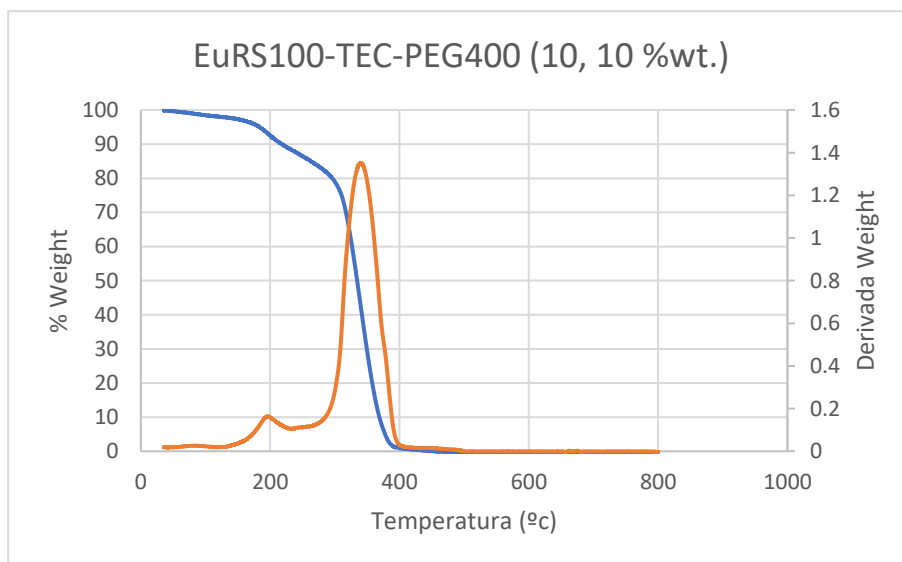


Figura A 8: TGA del filamento de EuRS100-PEG400 (10 wt.%), TEC (10 wt.%) y bupivacaína, en atmósfera de aire. La temperatura se da en °C. Se muestran la curva de la TGA (azul) y la DTG (naranja).

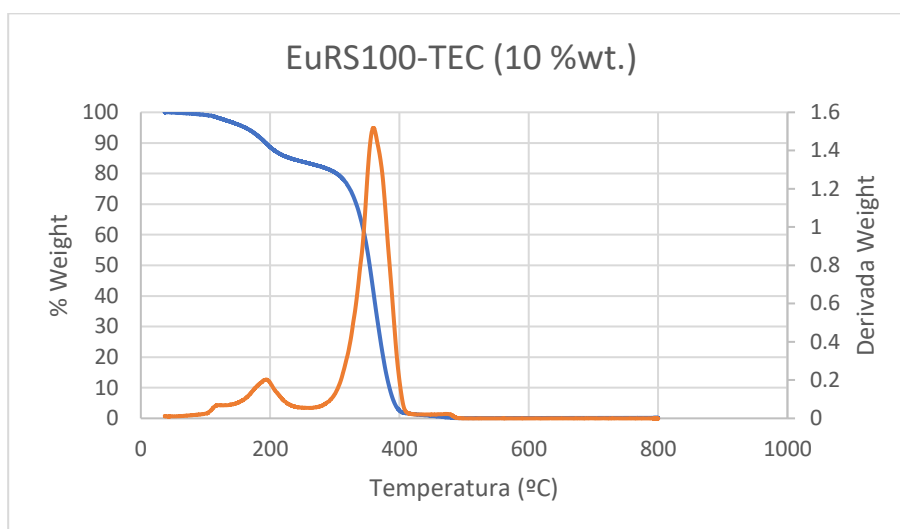


Figura A 9: TGA del filamento de EuRS100 TEC (10 wt.%) y bupivacaína, en atmósfera de aire. La temperatura se da en °C. Se muestran la curva de la TGA (azul) y la DTG (roja).

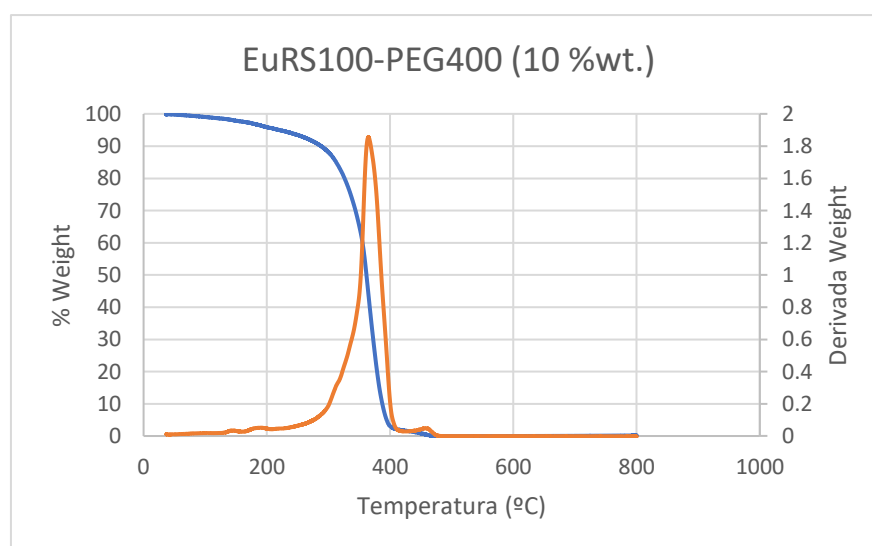


Figura A 10: TGA del filamento de EuRS100 PEG400 (10 wt.%) y bupivacaína, en atmósfera de aire. La temperatura se da en °C. Se muestran la curva de la TGA (azul) y la DTG (roja).

Si se comparan estas tres últimas gráficas con la Figura A 3, correspondiente a la mezcla Bupivacaina-EuRS100, se puede comprobar que, para una temperatura de 300 °C, hay mayor porcentaje de peso perdido en las muestras con plastificantes. Eso se debe a la presencia de los plastificantes que se degradan antes de llegar a los 200 °C (Tabla A 1).

Tabla A 1 Temperaturas de degradación obtenidas mediante termogravimetría (TGA) de los diferentes plastificantes

Temp. degradación TEC (°C)	Temp. degradación PEG400 (°C)
181,6	190,2

Sin embargo, como se aprecia en la Tabla A 2, la temperatura de máxima degradación de los apósitos que contienen dichos plastificantes apenas se ve afectada.

Tabla A 2 Temperaturas de degradación obtenidas mediante termogravimetría (TGA) de la bupivacaína, el EuRS100, la mezcla de ambos, y la mezcla de ambos con el trietil citrato (TEC) y el polietilenglicol 400 (PEG400), plastificantes

Temperatura degradación bupivacaína (°C)	Temperatura degradación EuRS100 (°C)	Temperatura degradación EuRS100-Bupivacaína (°C)	Temperatura degradación EuRS100-Bupivacaína-TEC (10 %wt.) (°C)	Temperatura degradación EuRS100-Bupivacaína-PEG400 (10 %wt.) (°C)	Temperatura degradación EuRS100-Bupivacaína-PEG400-TEC (10, 10 %wt.) (°C)
257,0	350,7	347,9	359,19	364,6	339,9

Los plastificantes se utilizan para mejorar las propiedades físicas de polímeros, como el EuRS100, los cuales son rígidos y frágiles. Además, también disminuyen las temperaturas de procesado de los materiales como, por ejemplo, la temperatura de transición vítrea o la de fusión.

Anexo 3: Análisis FTIR

Para comprobar si en los filamentos y en los parches finales había fármaco, su interacción con el polímero, y probar la presencia de los plastificantes, en el caso de haberlos usado en su fabricación, se hizo un análisis por FTIR¹.

En diferentes artículos se buscaron cuáles eran los picos característicos de los diferentes compuestos usados para la fabricación de los apósitos. Del EuRS100, por ejemplo, según Jana et al. (2013) o Barzegar et al (2011), los picos más característicos se dan en 2981 cm^{-1} debido a grupos de hidrocarburos (C-H) alifáticos y en 1724 cm^{-1} debido a $\text{C}=\text{O}$, entre otros. De la bupivacaína³⁵, el pico presente en la banda a 2926 cm^{-1} hace referencia a los grupos C-H. El que aparece a 1725 cm^{-1} se debe a $\text{C}=\text{O}$ y el de 1610 cm^{-1} al grupo N-H. El PEG400¹ tiene un pico característico en torno a 1100 cm^{-1} y otro cerca de 2800 cm^{-1} . Respecto al TEC¹, tiene picos en 1200 cm^{-1} , 1750 cm^{-1} , 2950 cm^{-1} y 3600 cm^{-1} .

Tras realizar los diferentes FTIR, se graficaron los espectros de vibraciones correspondientes a los diferentes materiales que componen el filamento (bupivacaína, EuRS100 y plastificante) y la propia curva de los filamentos en la misma gráfica. Se interpreta dicha gráfica fijándose en los máximos, que muestran los diferentes enlaces presentes en los compuestos analizados. Los espectros obtenidos de los diferentes compuestos preparados se muestran a continuación (Figuras A 11-15).

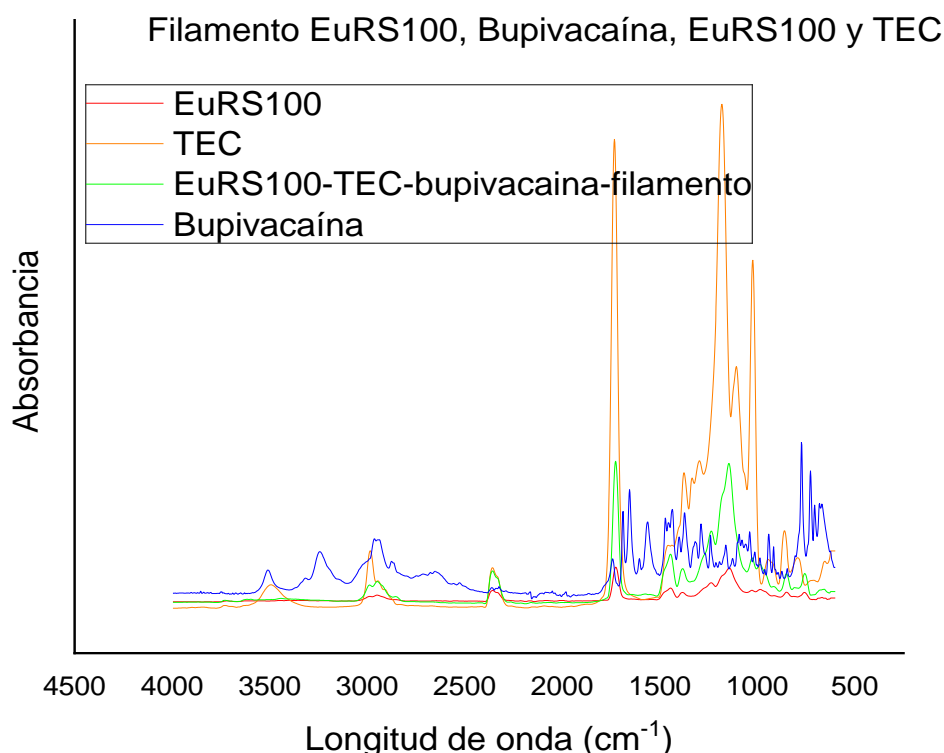


Figura A 11 Espectro FTIR del filamento de EuRS100-TEC 7 wt.% (verde) comparado con sus constituyentes: espectro del TEC (naranja), espectro del EuRS100 (rojo) y espectro de la bupivacaína libre (azul).

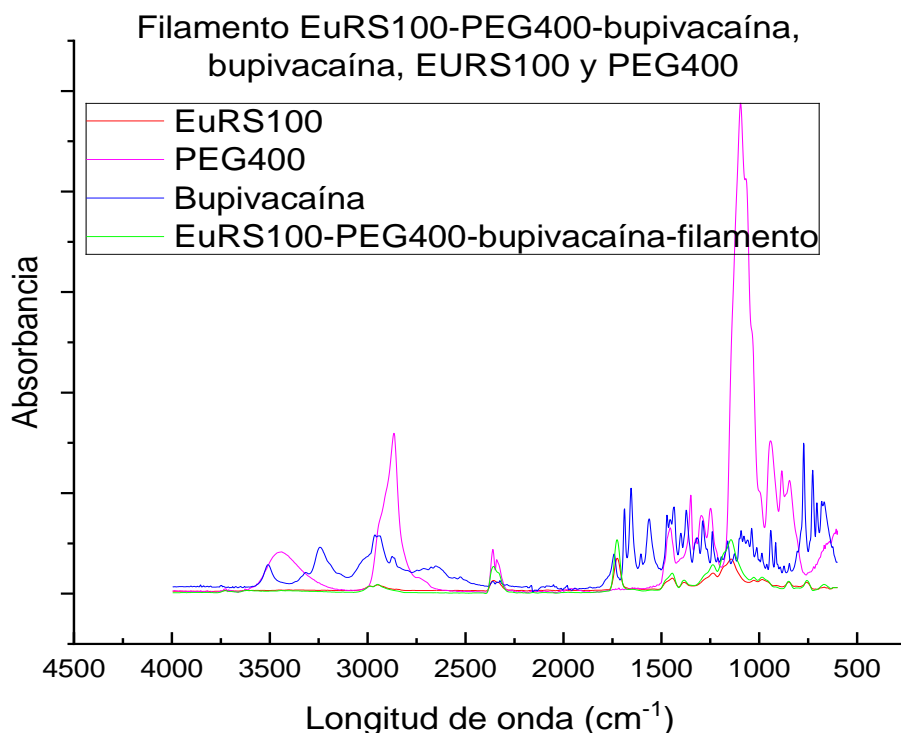


Figura A 12 FTIR del filamento de RS-PEG400-Bupivacaína (verde), FTIR del RS100 (rojo), FTIR del PEG400 (morado) y FTIR de la bupivacaína (azul).

Para saber si uno de los componentes individuales (polímero, fármaco o plastificante), está presente en la mezcla, se deberían ver sus máximos de vibración en el FTIR del filamento, o del apósito, que se estén midiendo.

En la Figura A 11 y en la Figura A 12 se puede apreciar la influencia del TEC/PEG400 (respectivamente) en el espectro del filamento (verde), ya que en las zonas en las que el espectro naranja/morado, el del TEC/PEG400 respectivamente, tiene un máximo de absorbancia, los espectros del EuRS100 (rojo) y el filamento (verde) se alejan más uno del otro.

Comparando en ambas figuras los espectros del polímero y de cada uno de los filamentos, de EuRS100-TEC-bupivacaína y EuRS100-PEG400-bupivacaína, se observa que ambos siguen los mismos patrones; sin aparecer en los correspondientes a los filamentos, los máximos de absorbancia de la bupivacaína, véase 1610 cm^{-1} y 1750 cm^{-1} de longitud de onda. Eso se debe a que hay muy poca cantidad de fármaco, como se ha mencionado en el estudio. Pero también podría ser porque el proceso está desnaturalizando el fármaco. Para descartar esta última posible causa se realizaron análisis FTIR a una muestra de la mezcla EuRS100 con bupivacaína antes del proceso de extrusión y otro antes de la impresión, Figura A 13.

En esta figura tampoco se aprecian los máximos del fármaco, lo que podría indicar que la cantidad de bupivacaína es inferior a la necesaria para poder observarla en los espectros mediante esta técnica.

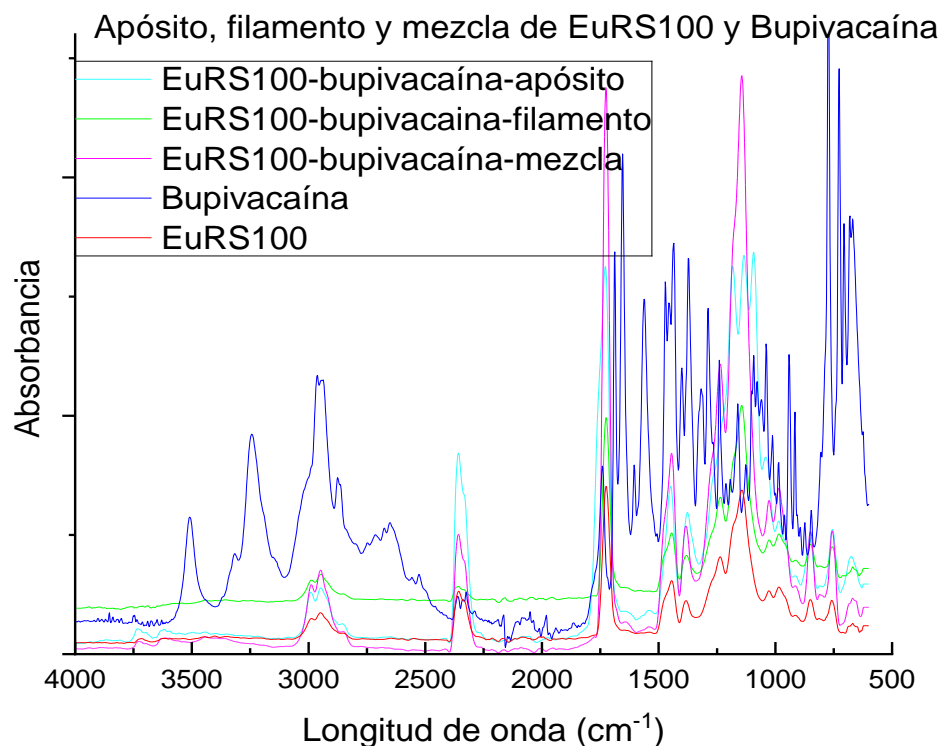


Figura A 13 FTIR del EuRS100-bupivacaína filamento (verde), FTIR del EuRS100-bupivacaína mezcla física (morado) y FTIR del EuRS100-bupivacaína parche (azul claro). La zona remarcada hace referencia al máximo de absorbancia de la bupivacaína presente en las mezclas.

Esta comparación de la Figura A 13 también sirve para comprobar que los proceso de extrusión e impresión no dañan la mezcla pese a las altas temperaturas de trabajo, como se había concluido de los estudios de TGA, ya que todos los espectros correspondientes a filamento, apósito o mezcla física son muy similares.

Las figuras A 14 y A 15, muestran el mismo estudio que el mostrado en la figura anterior, pero con la presencia del TEC en la Figura A 14 y la de ambos plastificantes a la vez en la Figura A 15. De las dos siguiente figuras (Figura A 14 y Figura A 15) se saca la misma conclusión. Se aprecia las influencias del TEC y del TEC-PEG400, respectivamente, pero no de la bupivacaína.

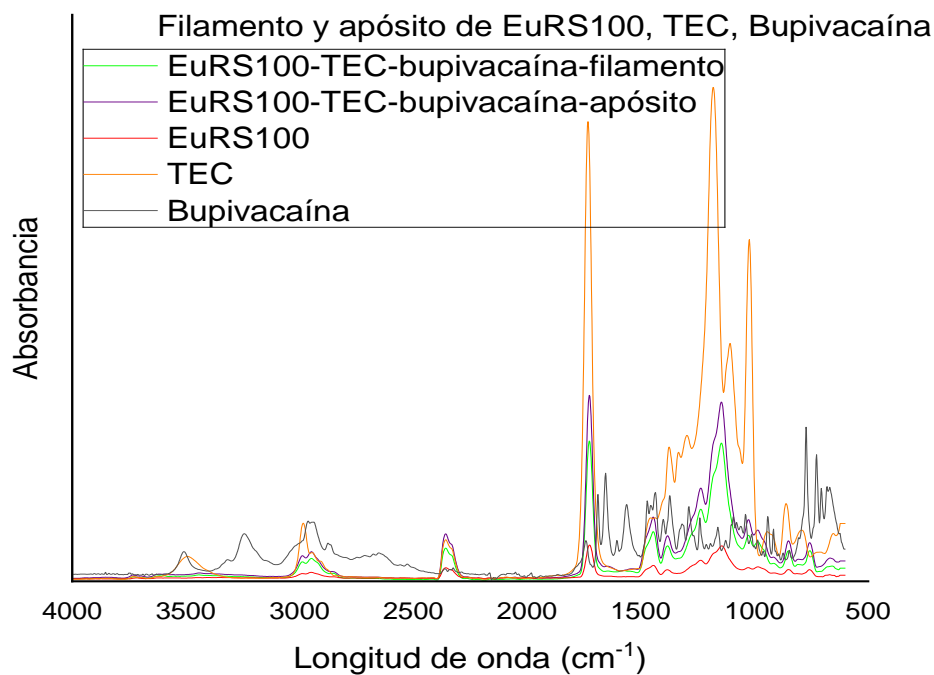


Figura A 14 FTIR del filamento de EuRS100-bupivacaína-TEC 7 wt%. (verde), FTIR del parche de EuRS100-bupivacaína-TEC 7 wt%. (morado), FTIR del EuRS100 (rojo), FTIR de la bupivacaína (negro) y FTIR del TEC (naranja).

En la Figura A 15, se nota la presencia del TEC y el PEG400 en los máximos que se ven a 1750 cm^{-1} , a 3000 cm^{-1} o a 1250 cm^{-1} .

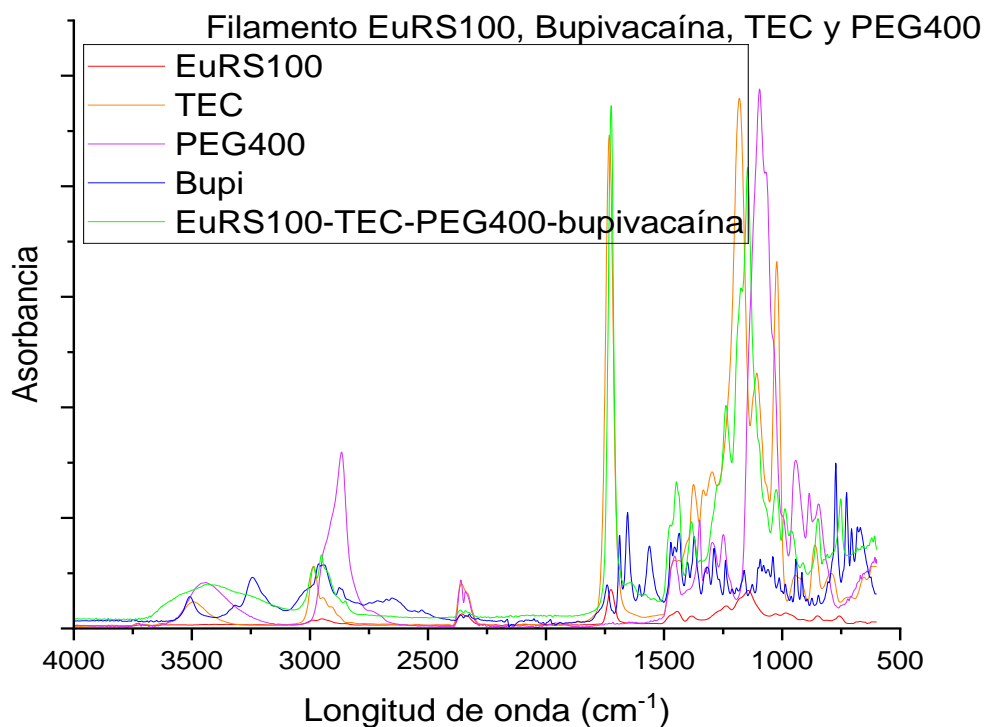


Figura A 15 FTIR del filamento EuRS100-bupivacaína-TEC-PEG400 10 wt.% (verde), FTIR del TEC (naranja), FTIR del PEG400 (morado) y FTIR de la bupivacaína (azul).

Adrián Tajadura Cubillo